

Universidade de Lisboa  
Faculdade de Ciências  
Departamento de Química e Bioquímica



# **Validação e Controlo da Qualidade da Quantificação de corantes em alimentos por HPLC-UV/Vis**

Ana Cecília Cruz da Rocha  
Dissertação

Orientadores:

Doutor Ricardo Jorge Neves Bettencourt da Silva

Engenheira Maria Jesus Caetano Tavares

Mestrado em Química

Especialização Química  
2015



## Agradecimentos

Este trabalho, fruto de um ano de trabalho, foi também fruto de todo o apoio de recebi. Muitos foram os que contribuíram para que eu chegasse até este ponto e aqui deixo um especial agradecimento,

Ao Professor Ricardo Bettencourt da Silva, por todo o apoio prestado, por toda a paciência, por ser um professor que acima de tudo é amigo dos seus alunos. É um excelente professor, e acima de tudo uma excelente pessoa, foi uma honra realizar este trabalho consigo.

À Engenheira Maria Jesus Tavares, por tornar possível a realização de um trabalho numa instituição que sempre pensei ser onde gostaria de trabalhar, obrigada pela oportunidade, pela orientação e apoio prestado, pela liberdade que me deu.

À Fernanda, que foi a minha companheira e por me receber tão calorosamente, fez-me sentir à vontade num ambiente novo.

À Teresa e à Helena, por me acompanharem e me ajudarem com todas as minhas dúvidas, me ensinarem o que precisava de saber no laboratório e me terem recebido tão amigavelmente.

Ao João, ao Tátá e ao Ramalho, por todos os reagentes que vos fiz fazer. Ao restante pessoal da ASAE, obrigado a todos por tão bem me receberem e tornarem um ambiente de trabalho tao simpático e divertido.

Aos que sempre são um apoio enorme, Joana, Anabela, Nobre e Cláudio, que ano! É tao bom saber que há pessoas que levam a amizade a sério, e vocês são o exemplo disso, obrigada por tudo.

Ao Nuno e ao Ricardo, que apesar que não estarem perto, estão sempre.

Finalmente, aos meus pais e ao meu irmão, por serem a base, por tornarem este trabalho possível, sem eles não teria chegado aqui.



## *Abstract*

---

Human beings have been changing foods since their earliest times in order to make them more appealing. The first food dyes were inorganic salts, being after noticed the use of animal and plant extracts as natural dyes, and synthetic organic compounds. Synthetic dyes are quite widespread due to its lower cost and higher stability compared to natural dyes.

Food dyes are classified in Regulation No 1333/2008 of the European Union as food additives and "substances which add or restore color in a foodstuff ...". This document also regulates the legal limits for their use due to toxicity presented by some and possible consumer error induction on the quality of the product. It is important to ensure compliance with these regulations, in Portugal ensured by ASAE responsible for monitoring the quality and safety of foodstuffs, for consumer protection and fair competition between producers.

The monitoring of food dyes use is based on their quantification in foodstuffs and comparison with legal limits. The decision on the compliance of food depends on measurements quality quantified by measurements uncertainty.

In this work it was developed, validated and defined the internal quality control of the quantification of three food dyes by HPLC-UV/Vis. The validation culminated in the detailed evaluation of the measurement uncertainty by the "bottom-up" or subanalytical approach. The studied dyes were sunset yellow, brilliant blue, curcumin, Ponceau 4R and brilliant black.

The method development involved the definition of a strategy for calibrators preparation that ensures the validity of regression model assumptions. The method validation was focused on assessing instrumental response variance homogeneity, the assessment of regression model fitness to describe instrumental signals, the determination of detection and quantification limits under repeatability conditions and the evaluation of measurement uncertainty. The adequacy of measurement uncertainty estimation was evaluated by analyzing control standards equivalent to the calibrators as well as by assessing recovery of analyte added to juice samples.

The weighting factors of the performed weighted regressions were set from a prior detailed evaluation of precision variation with analyte concentration.

For curcumin determination, the unweighted linear regression model adequately describes signal variation in the studied concentration range (3 - 12 mg L<sup>-1</sup>). For the remaining dyes the weighted linear regression model was determined as appropriate to describe the studied calibration range (1.5 to 7.5 mg L<sup>-1</sup>). The limits of quantification estimated under repeatability conditions are always lower than the lowest level of the calibration range. The estimated relative expanded uncertainty is smaller than a target value of 20 %, proving measurements are fit for their intended use. The measurement intermediate precision was determined despite the tests being controlled under repeatability conditions.

The estimated and known concentrations of control standards are generally compatible, indicating the adequacy of the developed measurement uncertainty models.

The estimated analyte recovery in juice is not compatible with the ideal value of 100 %, suggesting that measurements of juice samples are affected by an additional source of uncertainty. Having in mind the selectivity of HPLC-UV/Vis determinations, it is suspected to occur analyte adsorption in juice suspended particles, which will be evaluated in future work.

It was developed and validated a MS-Excel spreadsheet which can be used for routine determination of samples concentration with the respective uncertainty and to perform tests quality control.

**Keywords:** Food dyes; Additives; Method Validation; Uncertainty; Linear regression.

## Resumo

---

Desde sempre se observou a tendência do ser humano em modificar os alimentos para torná-los mais apelativos. Os primeiros corantes alimentares utilizados foram sais inorgânicos, sendo posteriormente registada a utilização de extratos de animais e plantas para corantes de origem natural e compostos orgânicos sintéticos. Os corantes sintéticos estão bastante disseminados devido ao seu menor custo e maior estabilidade quando comparados com os corantes de origem natural.

Os corantes alimentares são classificados no Regulamento nº 1333/2008 da União Europeia como aditivos alimentares e *“Substâncias que conferem ou restituem cor a um género alimentício ...”*. Este documento regula também os limites legais da sua utilização devido à toxicidade apresentada por alguns e à indução em erro do consumidor acerca da qualidade do produto. É importante o controlo do cumprimento destas regras, sendo que em Portugal compete à ASAE, entidade responsável pela monitorização da qualidade e segurança dos alimentos, visando essencialmente a defesa do consumidor e a justa concorrência.

A fiscalização da utilização de corantes alimentares incide sobre a quantificação do teor destes nos alimentos comparando com os limites legais. A decisão sobre a conformidade dos alimentos é função da qualidade das medições quantificada pela incerteza dos resultados.

Neste trabalho foi desenvolvido, validado e definido o controlo de qualidade da quantificação de três corantes alimentares por HPLC-UV/Vis. A validação culminou na avaliação detalhada da incerteza da medição pela abordagem “bottom-up” ou subanalítica. Os corantes estudados foram o amarelo sol, azul brilhante, curcumina, o ponceau 4R e preto brilhante.

O desenvolvimento do método envolveu a definição de uma estratégia de preparação dos calibradores capaz de assegurar o cumprimento dos pressupostos do modelo de regressão utilizado. A validação do método incidiu sobre a avaliação da homogeneidade da variância da resposta instrumental, o estudo do ajuste do modelo de regressão para descrever os sinais instrumentais, o cálculo dos Limites de Detecção e Quantificação em condições de repetibilidade e a avaliação da incerteza da medição. A adequação da estimativa da incerteza da medição foi avaliada através da análise de

padrões de controlo equivalentes aos calibradores, bem como através de ensaios de recuperação de analito adicionado a amostras de sumo.

Os fatores de ponderação das regressões ponderadas realizadas foram definidos considerando uma avaliação detalhada prévia da variação da precisão com a concentração.

No caso da determinação de curcumina, o modelo de regressão linear não ponderado descreve adequadamente a variação do sinal na gama de concentrações estudada (3 - 12 mg L<sup>-1</sup>). Para os restantes corantes o modelo de regressão linear ponderado foi o considerado adequado na gama de calibração estudada (1,5 – 7,5 mg L<sup>-1</sup>). Os limites de quantificação estimados em condições de repetibilidade são sempre menores que o ponto mais baixo da gama de calibração. A incerteza expandida relativa estimada é menor que um valor alvo de 20 %, provando a adequação da medição para o fim em vista. Foi determinada a precisão intermediária das medições apesar dos ensaios serem controlados em condições de repetibilidade.

Os teores estimados e esperados dos padrões de controlo são na generalidade compatíveis, indicando a adequação do modelo desenvolvido de avaliação da incerteza. A recuperação estimada não é compatível com o valor ideal de 100 % sugerindo que as medições em amostras reais são afetadas por uma fonte de incerteza adicional. Tendo em conta a seletividade das determinações por HPLC-UV/Vis, suspeita-se da ocorrência de adsorção de analito às partículas de sumo em suspensão, que será avaliada em trabalho futuro.

Foi desenvolvida e validada uma folha de cálculo que poderá ser usada em rotina para a determinação da concentração de amostras com a respetiva incerteza e o controlo da qualidade dos ensaios.

*Palavras-chave: Corantes alimentares; Aditivos; Validação de métodos; Incerteza; Regressão linear.*



## *Glossário de abreviaturas e símbolos*

---

EFSA – European Food Safety Authority

UE – União Europeia

ASAE – Autoridade de segurança alimentar e económica

CE – Conselho Europeu

VIM – Vocabulário Internacional da Metrologia

LOD – Limite de deteção

LOQ – Limite de quantificação

ANOVA – Análise de variâncias

*RSD* – Relative Standard Deviation

Teste F – Teste de Fischer

$F_{calc}$  – Valor de F calculado

$S_1^2$  – Variância da resposta instrumental para o padrão 1

$S_2^2$  – Variância da resposta instrumental para o padrão 2

$R$  – Coeficiente de correlação de Pearson

$\hat{y}_{ij}$  - sinal estimado

$y_{ij}$  – sinal obtido

$\chi^2$  – Teste estatístico CHI-Quadrado

$u'_{R\ max}$  - Incerteza padrão relativa da razão da concentração máxima

$u_{p\ max}$  - Incerteza padrão máxima associada ao manuseamento da pipeta

$u_{b\ max}$  - Incerteza padrão máxima associada à volumetria do balão

$R_{max}$  – Razão da concentração máxima

$p_{max}$  – Volume medido com a pipeta

$b_{max}$  – Volume medido com o balão

$y$  – Sinal instrumental

$a$  – Ordenada na origem da curva de calibração

$b$  - Declive da curva de calibração

$x$  – Concentração

$n$  - Número de pontos experimentais

$(\bar{x}, \bar{y})$  – Centróide não ponderado por onde passa a linha de regressão

$\bar{x}$  – Média aritmética dos valores de  $x_i$

$\bar{y}$  - Média aritmética dos valores de  $y_i$

$s_{y/x}$  - Desvio padrão residual

$x_0$  - Concentração de uma amostra desconhecida

$y_0$  - Sinal obtido experimentalmente

$s_{x0}$  - Desvio padrão associado a  $x_0$

$m$  - Número de medições de  $y_0$  realizadas

$u'_{RAB}$  - Incerteza padrão relativa associada á razão das concentrações do par de calibradores contíguos A e B.

$s'_B$  – Desvio padrão relativo do calibrador B

$u'_{Fd(A)}$  - Incerteza padrão relativa do fator de diluição  $F_{d(A)}$  da preparação do respetivo calibrador

$u'_{Fd(B)}$  - Incerteza padrão relativa do fator de diluição  $F_{d(B)}$  da preparação do respetivo calibrador

$w_i$  - Fator de ponderação

$s_i$  - Desvio padrão da repetibilidade do sinal instrumental  $i$ .

$(\bar{x}_w, \bar{y}_w)$  - Coordenadas do centróide ponderado

$b_w$  – Declive ponderado

$a_w$  – Ordenada na origem ponderada

$s_{y/x_w}$  - Desvio padrão residual ponderado

$w_0$  - Fator de ponderação associado aos sinais instrumentais únicos usados para estimar a concentração da amostra

$\bar{q}_0$  - Concentração da amostra

$s_0$  - Desvio padrão do sinal instrumental da amostra

$R$  – Recuperação

$c_{fort}$  - Concentração estimada da amostra fortificada

$c_{nat}$  - Concentração de analito nativo

$c_{ad}$  – Concentração adicionada

$u_m$  – Incerteza associada à pesagem

$u_{bal}^{calibração}$  - Incerteza associada à linearidade da resposta da balança

$u_{bal}^{repetibilidade}$  - Incerteza associada à repetibilidade da pipeta

$u_v$  – Incerteza associada a uma volumetria

$u_{Fv}$  – Incerteza associada às diluições

$u_{\bar{q}_0}$  - Incerteza padrão associada à quantificação de uma amostra por um método instrumental de análise

$u'_c$  – Incerteza padrão relativa dos calibradores

$SS_r$  - Soma dos quadrados dos residuais

$SS_E$  - Soma dos quadrados do erro puro

$SS_{lof}$  - Soma dos quadrados relativa à falta de ajuste

$MS_E$  – Média dos quadrados do erro puro

$MS_{lof}$  - Média dos quadrados do erro puro

$SS_{(w)r}$  – Soma ponderada dos quadrados dos residuais

$SS_{(w)E}$  – Soma ponderada dos quadrados do erro puro

$SS_{(w)lof}$  – Soma ponderada dos quadrados relativos à falta de ajuste

$MS_{(w)E}$  – Média ponderada dos quadrados do erro puro

$MS_{(w)lof}$  - Média ponderada dos quadrados do erro puro

$u_{dif}$  - Incerteza padrão da diferença entre a  $C_{ref}$  e a  $C_{obt}$

$C_{ref}$  – Concentração de referencia

$C_{obt}$  – Concentração obtida

$s'_{pl}$  - Precisão intermediária relativa

$u_R$  - Incerteza padrão da recuperação

$u_{C_{ad}}$  - Incerteza padrão associada a  $C_{ad}$

$u_{C_{fort}}$  - Incerteza padrão associada a  $c_{fort}$

$u_{C_{nat}}$  - Incerteza padrão associada a  $c_{nat}$



# Índice

---

Agradecimentos .....	i
Abstract .....	iii
Resumo.....	v
Glossário de abreviaturas e símbolos .....	vii
Índice .....	xi
Índice de Figuras .....	xiii
Índice de tabelas .....	xiv
1. Introdução.....	17
1.1. Corantes alimentares .....	3
1.2. Indústria Alimentar .....	4
1.3. Validação de métodos.....	9
1.4. Modelos de regressão .....	12
1.4.1. Modelo de regressão linear não ponderado.....	12
1.4.2. Modelo de regressão linear ponderado.....	16
1.5. Incerteza da medição .....	20
1.5.1. Avaliação da incerteza associada a uma pesagem por diferença .....	21
1.5.2. Avaliação da incerteza associada a uma volumetria.....	22
1.5.3. Avaliação da incerteza associada a uma quantificação instrumental.....	23
1.5.4. Avaliação da incerteza associada à recuperação .....	24
2. Parte Experimental.....	25
2.1. Reagentes.....	27
2.2. Material .....	29
2.3. Preparação dos Calibradores .....	30
2.4. Verificação de Homogeneidade de variâncias .....	31
2.5. Curva de calibração .....	33
3. Tratamento e Discussão de Resultados .....	35
3.1. Calibradores .....	36
3.2. Avaliação da ocorrência de valores aberrantes .....	39
3.3. Homogeneidade de variâncias .....	40
3.4. Linearidade.....	42
3.5. Ajuste ao modelo de regressão.....	44
3.5.1. Modelo de regressão linear não ponderado.....	44

3.5.2.	Modelo de regressão linear ponderado.....	46
3.6.	Calibração por regressão não ponderada para a determinação da concentração de uma amostra desconhecida. ....	49
3.6.1.	Incerteza associada à concentração estimada por HPLC-UV/Vis.....	51
3.7.	Calibração por regressão ponderada para a determinação da concentração de uma amostra desconhecida. ....	52
3.7.1.	Incerteza associada à concentração estimada por HPLC-UV/Vis.....	53
3.7.2.	Definição do modelo de variação da precisão do sinal com a concentração .....	54
3.8.	Precisão intermediária da resposta instrumental.....	56
3.9.	Recuperação de analito em amostras reais .....	57
4.	Conclusões.....	59
5.	Anexos.....	63
A.	Introdução .....	65
A.	Parte Experimental.....	66
B.	Tratamento e Discussão de Resultados .....	70
C.	Folhas de cálculo .....	80
6.	Bibliografia .....	93

## Índice de Figuras

---

Figura 1.1 - Exemplos de aplicações de corantes alimentares.....	4
Figura 1.2 - Teste F para a determinação da precisão da resposta instrumental.....	10
Figura 1.3 - Coeficiente de correlação linear de Pearson em três situações distintas. ....	11
Figura 1.4 - Seleção de teste estatístico de ajuste ao modelo de regressão linear em função do comportamento da precisão da resposta instrumental. ....	12
Figura 1.5 - Estratégia a seguir para chegar ao resultado final da incerteza .....	20
Figura 1.6 - Diagrama de causa-efeito .....	21
Figura 2.1 - Corantes utilizados; A) Azul Brilhante; B) Preto Brilhante; C) Amarelo sol; D) Ácido Carmínico; E) Curcumina; F) Ponceau 4R.....	27
Figura 2.2 - Montagem experimental do sistema HPLC; A) Forno para controlo da temperatura, B) Detetor UV/vis, C) Bomba, D) Auto-sampler e E) Sistema de aquisição para tratamento de dados.....	29
Figura 2.3 - Estratégia de preparação dos calibradores para a avaliação da homogeneidade de variâncias da resposta instrumental .....	31
Figura 2.4 - Ilustração da preparação dos calibradores .....	34
Figura 3.1 - Curvas de calibração obtidas considerando sinais de 5 níveis de concentração de cada corante.....	42
Figura 3.2 - Residuais obtidos considerando sinais de 5 níveis de concentração de cada corante .....	43
Figura 3.3 - A) Variação estimada de $s_i$ com a concentração $x_i$ (○) e modelo inicialmente definido para variação de $s_i$ com $x_i$ (—); B) Modelo majorado de variação de $s_i$ com a concentração $x_i$ . ....	55
Figura B.1 - Cromatograma do composto puro do corante amarelo sol. ....	66
Figura B.2 - Cromatograma do composto puro do corante azul brilhante .....	66
Figura B.3 - Cromatograma do composto puro do corante curcumina .....	67
Figura B.4 - Cromatograma do composto puro do corante ponceau 4R.....	67
Figura B.5 - Cromatograma do composto puro do corante preto brilhante.....	68
Figura B.6 – Cromatograma da mistura de azul brilhante e preto brilhante.....	68
Figura B.7 - Cromatograma da mistura de curcumina e ponceau 4R .....	69

## Índice de tabelas

---

Tabela 1.1 - Características gerais dos corantes utilizados[5]–[9] .....	7
Tabela 1.2 - Limites legais associados aos corantes estudados quando permitidos .....	8
Tabela 2.1 - Variação da composição da mistura do eluente ao longo da corrida. ....	28
Tabela 2.2 - Volume de solução mãe utilizado para fazer os corantes aos 5 níveis de quantidade .....	33
Tabela 3.1- Valores para avaliação do pressuposto do modelo de regressão sobre a qualidade dos calibradores. ....	37
Tabela 3.2 - Valores de $F_{cal}$ e $F_{tab}$ para avaliação da variação da precisão da resposta instrumental na gama de calibração .....	41
Tabela 3.3 – Valores de $F_{cal}$ e $F_{tab}$ usados na avaliação do ajuste do modelo de regressão linear ponderado aos sinais dos analitos estudados.....	49
Tabela C.1 - Resultados para o cálculo da repetibilidade da pipeta utilizada na preparação dos calibradores.....	70
Tabela C.2 - Resultados para o cálculo da repetibilidade do balão de 20 mL utilizada na preparação dos calibradores.....	70
Tabela C.3 - Valores críticos de T para o teste de valores aberrantes únicos de Grubbs .....	71
Tabela C.4 - Valores dos sinais experimentais para o cálculo da homogeneidade de variâncias do corante Azul-Brilhante .....	72
Tabela C.5 - Valores dos sinais experimentais para o cálculo da homogeneidade de variâncias do corante Preto-Brilhante .....	72
Tabela C.6 - Valores dos sinais experimentais para o cálculo da homogeneidade de variâncias do corante Amarelo-sol.....	73
Tabela C.7 - Valores dos sinais experimentais para o cálculo da homogeneidade de variâncias do corante Ponceau 4R .....	73
Tabela C.8 - Valores dos sinais experimentais para o cálculo da homogeneidade de variâncias do corante Curcumina.....	74
Tabela C.9 - Sinais instrumentais obtidos para 5 níveis de concentração de cada corante em condições de repetibilidade .....	75
Tabela C.10 - Valores de desvio padrão, parâmetros da linha de regressão ponderada e fator de ponderação calculados para o corante Amarelo-sol.....	76
Tabela C.11 - Valores de desvio padrão, parâmetros da linha de regressão ponderada e fator de ponderação calculados para o corante Azul Brilhante.....	76



Tabela C.12 - Valores de desvio padrão, parâmetros da linha de regressão ponderada e fator de ponderação calculados para o corante Preto Brilhante.....	77
Tabela C.13 - Valores de desvio padrão, parâmetros da linha de regressão ponderada e fator de ponderação calculados para o corante Ponceau 4R .....	77
Tabela C.14 - Concentrações e respetivo desvio padrão relativo da precisão intermédia para o corante azulm brilhante; Resultados com um valor aberrantes.....	78
Tabela C.15 - Concentrações e respetivo desvio padrão relativo da precisão intermédia para o corante amarelo sol; .....	78
Tabela C.16 – Concentrações e respetivo desvio padrão relativo da precisão intermédia para o corante preto brilhante; Resultados com dois valores aberrantes.....	79



---

## *1. Introdução*

---



## 1.1. Corantes alimentares

---

Desde os tempos antigos que existe a necessidade de modificar a cor e sabor dos alimentos recorrendo a substâncias artificiais. Visa-se essencialmente torná-los mais apelativos ao olho do consumidor, para que provoquem o desejo de compra, ou que tenham a cor tomada como preferida do alimento, ainda que não tendo qualquer influência no sabor. O objetivo é apenas a aparência, não havendo qualquer interesse ou efeito no valor nutricional do alimento.

Os primeiros corantes foram usados na forma de sais inorgânicos (sulfato de cobre, cromato de chumbo e sulfato de mercúrio) e eram utilizados em produtos como manteiga ou doces [1]. No entanto, estes sais inorgânicos, que continham metais pesados, eram tóxicos e a sua ingestão provocava doenças ou até a morte[2].

Nos primeiros tempos os corantes mais utilizados foram os de origem natural, extraídos de plantas e animais, como é o exemplo da *Cochonilla* obtido a partir de insetos esmagados [2].

Com a síntese do primeiro corante orgânico “mauve” por Sir William Perkin, através da oxidação da anilina, [1] assistiu-se a um crescimento da síntese de uma grande variedade de corantes com base orgânica, e assim, os corantes inorgânicos tóxicos conhecidos foram substituídos. Estes corantes artificiais tornaram-se preferidos aos seus homólogos naturais, pois a sua produção era menos dispendiosa, tinham uma maior estabilidade e melhores propriedades corantes[2].

Com a ampla utilização de corantes em todo o mundo tornou-se necessário o seu controlo pelas autoridades, criando-se legislação, pois alguns destes são produtos tóxicos para o consumidor. Atualmente a EFSA (Autoridade Europeia de Segurança Alimentar) está a avaliar estudos que indicam que certos corantes induzem hiperatividade em crianças, tais como o Amarelo-sol e o Ponceau4R [1][2]. Estes estudos refletem a necessidade de uma avaliação dos riscos de utilização dos corantes, sendo que em certos países já levaram à eliminação da sua utilização.

Neste âmbito, não existe uma regulamentação mundial uniforme relativa aos corantes, pois as regras variam de país para país, o que dificulta os processos de importação e

exportação. Um corante que pode ser utilizado num país, pode ser de utilização ilegal noutra.[2]. No entanto, a nível comunitário existe uma lista de corantes permitidos em alimentos, determinando nalguns casos doses máximas de utilização. Estas regras estão estipuladas no Regulamento nº 1333/2008 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 16 de Dezembro de 2008, relativo aos aditivos alimentares[3].

Atualmente surge uma nova tendência que pode trazer complicações relativamente a interpretações legislativas, que é a utilização de géneros alimentícios como corantes (caso das frutas e vegetais que tenham um efeito corante). Estas substâncias corantes vêm mencionadas na rotulagem como corante de origem natural, mas nem todos são seguros e não são reconhecidos como aditivos pela Regulação da UE.

## *1.2. Indústria Alimentar*

---

Os corantes alimentares são amplamente utilizados na indústria alimentar. O seu objetivo é fazer com que os produtos atinjam uma determinada cor, ou que a mantenham durante um largo período de tempo quando há o risco de a cor original se degradar. O consumidor quer ver alimentos com a tonalidade tomada como a certa para o alimento, pois quer ver carne vermelha, queijo amarelado, sumos com determinadas cores, doces com cores apelativas para as crianças e outros aspetos apelativos. Assim, como a cor influencia a compra do produto os fabricantes recorrem à utilização de corantes para garantir que o alimento é apelativo.



*Figura 1.1 - Exemplos de aplicações de corantes alimentares*  
(Adaptado de Hussel.)

No entanto, esta utilização apesar de regulamentada e controlada pelas autoridades competentes para tal, pode levantar outras questões: Pode um queijo com uma melhor apresentação ser mais saboroso que outro que tem outra tonalidade? E pode

haver uma concorrência justa entre fabricantes que recorrem a corantes e aqueles que não o fazem mantendo o produto o mais natural possível e possivelmente melhor que os primeiros?

Os corantes alimentares são classificados como aditivos e são definidos pelo Regulamento nº 1333/2008 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 16 de Dezembro de 2008 relativo aos aditivos alimentares como: *“Substâncias que conferem ou restituem cor a um género alimentício; incluem componentes naturais de géneros alimentícios e substâncias naturais, que normalmente não são consumidos como géneros alimentícios em si mesmos nem utilizados como ingredientes característicos dos géneros alimentícios”*

De acordo com o regulamento acima citado, um corante pode ser incluído na lista da diretiva comunitária de corantes permitidos em alimentos, se cumprir as funções de restituir a aparência original aos alimentos, tornar o alimento visualmente mais atrativo e conferir cor a um género alimentício dela desprovido[3].

Apesar de existir uma legislação e limites legais associados aos corantes alimentares que podem ser utilizados, é essencial um controlo químico destes compostos, pois podem apresentar perigo quando ultrapassado o limite. Outra questão é a da concorrência justa entre fabricantes, pois quem não cumpre as regras, pode sempre beneficiar com a utilização indevida de corantes. Assim, entram aqui duas vertentes, a defesa do consumidor e a justa concorrência.

Estes dois aspetos são objetivos da ASAE (Autoridade de Segurança Alimentar e Económica). A ASAE tem por missão a *“fiscalização e prevenção do cumprimento da legislação reguladora do exercício das atividades económicas, nos setores alimentar e não alimentar, bem como a avaliação e comunicação dos riscos na cadeia alimentar”*[4]. Sendo os corantes uma possível fonte de risco para a cadeia alimentar, a ASAE tem em conta esta problemática, sendo a entidade nacional com competência para o seu controlo.

Para um controlo fidedigno dos alimentos é essencial que exista um método analítico de controlo, validado para o propósito a que se propõe.

Neste trabalho foram estudados 5 corantes, tendo como objetivo a validação de um método para a quantificação dos mesmos em géneros alimentícios de matriz aquosa.

Os 5 corantes em causa são o Azul Brilhante, Preto Brilhante, Ponceau 4R, Curcumina e numa primeira tentativa o Ácido Carmínico, sendo que foi substituído após uma primeira análise pelo Amarelo-sol. Foram selecionados estes corantes por estarem sujeitos a limites legais de utilização e alguns deles apresentarem potencialmente efeitos nocivos para o consumidor.

Na tabela 1 podem-se ver as características principais dos corantes citados.

Foi validado um método para a quantificação por HPLC-UVvis (HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência) para cada corante acima descrito. O presente trabalho não discute em detalhe a confirmação da identidade dos corantes alimentares devido á variabilidade da resposta instrumental relativamente aos tempos de retenção de cada corante.

Dos corantes selecionados, apenas a Curcumina é de origem natural, sendo obtida através de uma extração com solvente do açafrão. O Azul Brilhante, Preto Brilhante, Ponceau 4R e Amarelo-sol são todos de origem sintética.

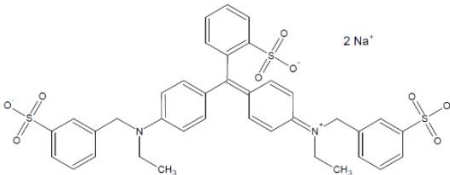
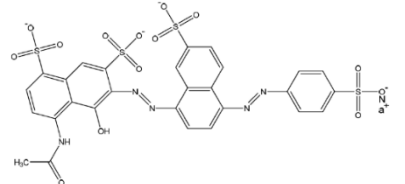
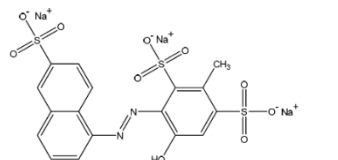
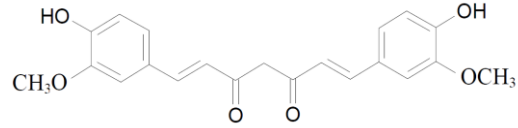
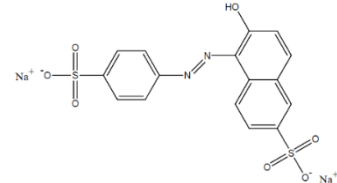
A curcumina é um corante alimentar estável a pH ácido mas não muito estável á luz, especialmente quando se encontra em solução[5].

Os corantes sintéticos no geral são instáveis quando combinados com agentes oxidantes ou redutores que estejam presentes nos alimentos. Isto deve-se ao facto da cor depender da existência de um sistema conjugado insaturado na molécula do corante, e qualquer substância que modifique este sistema pode provocar a mudança da cor[4-7].

Apesar deste contra, a utilização industrial dos corantes sintéticos, apresenta grandes vantagens relativamente aos naturais pois são altamente estáveis á luz e ao pH, apresentam uma grande uniformidade da cor, uma baixa contaminação microbiana e um baixo custo de produção[10].



Tabela 1.1 - Características gerais dos corantes utilizados[5]–[9]

Nome comum	Outros nomes associados	Número E	Número CAS	Cor	Formula Química	Estrutura
<b>Azul Brilhante</b>	Food Blue N°1; FD&C Blue N°1	E133	3844-45-9	Azul escuro	$C_{37}H_{32}N_2Na_2O_9S_3$	
<b>Preto Brilhante</b>	Black PN	E151	2519-30	Roxo	$C_{28}H_{17}N_5Na_4O_{14}S_4$	
<b>Ponceau 4R</b>	New Coccine Red 102; Coccine Red	E124	2611-82-7	Vermelho	$C_{20}H_{11}N_2Na_3O_{10}S_3$	
<b>Curcumina</b>	Turmeric Yellow; Kurum; CI Natural Yellow 3	E100	458-37-7	Amarelo	$C_{22}H_{20}N_6OCH_3$	
<b>Amarelo-sol</b>	Food Yellow N°5; FD&C Yellow N°6	E110	2783-94-0	Amarelo alaranjado	$C_{16}H_{10}N_2Na_7O_7S_2$	

Todos estes corantes têm associados determinados limites legais, logo são permitidos na União Europeia, até esse limite. Quando os corantes não apresentam um limite definido para um determinado alimento é porque não são permitidos. Na tabela seguinte são resumidos os limites associados a cada um dos corantes sendo apresentados os limites máximos admissíveis em todos os alimentos onde a sua utilização é permitida:

*Tabela 1.2 - Limites legais associados aos corantes estudados quando permitidos*[3], [5-9]

<b>Nome comum</b>	<b>Nível máximo permitido Alimentos (mg kg<sup>-1</sup>)</b>	<b>Nível máximo permitido Bebidas (mg L<sup>-1</sup>)</b>
<b>Azul Brilhante</b>	20 - 500	Até 200
<b>Preto Brilhante</b>	50 - 500	Até 200
<b>Ponceau 4R</b>	50 - 500	Até 200
<b>Curcumina</b>	20 - 500	Até 200
<b>Amarelo-sol</b>	50 - 500	Alcoólicas – Até 200 Não alcoólicas – Até 50

Os dados apresentados na tabela 2 podem ser vistos com mais detalhe, consultando os limites para cada alimento especificamente, nos documentos da EFSA relativos a avaliação de cada corante bem como no Regulamento CE 1333/2008 [3], [5-9]

### *1.3. Validação de métodos*

---

A validação é definida na terceira edição do Vocabulário Internacional da Metrologia, VIM, [11] como “Verificação onde os requisitos especificados são adequados para a utilização pretendida” e pela ISO 17025 como “ (...) a confirmação, através de exame e apresentação de evidência objetiva, de que os requisitos específicos relativos a uma dada utilização pretendida são satisfeitos.”[12]

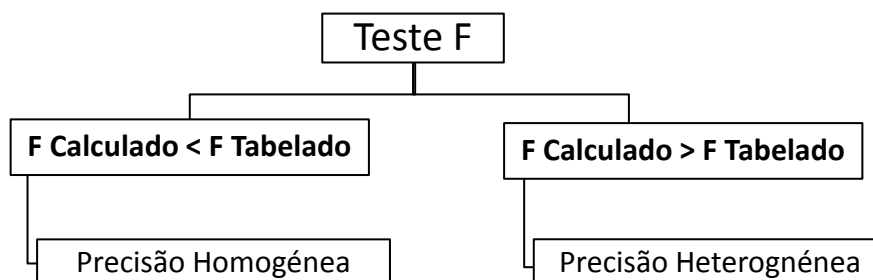
Para validar um método é necessário numa primeira análise saber o objetivo do trabalho a ser executado, para assim selecionar todos os parâmetros que irão ser avaliados (seletividade, linearidade, LOD, LOQ, etc.) e os respetivos requisitos para valores quantitativos das características.

Para o trabalho apresentado foi otimizado o modo de preparação dos padrões de calibração, avaliaram-se a linearidade, homogeneidade de variâncias, LOD, LOQ, ajuste ao modelo de regressão ponderado e não ponderado, recuperação de analito adicionado (e eventuais efeitos de matriz) e incerteza. A quantificação instrumental foi feita recorrendo a um HPLC acoplado a um UVvis. O HPLC é um método cromatográfico caracterizado pela sua alta sensibilidade. É adequado para a separação de compostos não voláteis ou termicamente instáveis. Este método é normalmente acoplado a um detetor, e no caso do presente trabalho foi utilizado um detetor de absorvâncias, UVvis [13].

O primeiro passo foi avaliar o comportamento da precisão da resposta instrumental ao longo da gama de calibração recorrendo ao teste F (Teste de Fischer), para avaliar a diferença de variâncias da resposta instrumental ao mais alto e ao mais baixo nível de concentração da gama de calibração analítica, calculando-se o F experimental a partir da equação 1.1 [14] e comparando-se com o F tabelado (para um nível de confiança de 99% e os respetivos graus de liberdade) que pode ser consultado numa tabela (Anexo A – Tabela A.1) ou consultado com a função F no Excel. Este teste tem a vantagem de só necessitar de dois níveis de concentração para além de ser o recomendado pela ISO.[15]

$$F_{calc} = \frac{s_1^2}{s_2^2} \quad (1.1)$$

De acordo com os resultados, comparando o valor de F conclui-se se os dados têm uma variação homogénea ou não homogénea da precisão da resposta instrumental ao longo da gama de calibração.

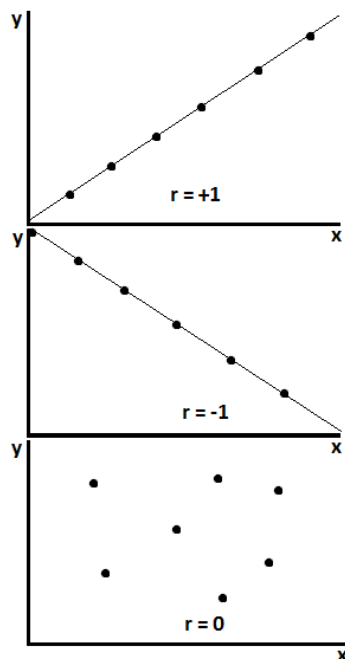


*Figura 1.2 - Teste F para a determinação da precisão da resposta instrumental*

A Linearidade da resposta instrumental é avaliada recorrendo a medições de soluções com concentração de analito conhecida (i. e. calibradores) que cubram a gama de trabalho desejada. Os resultados são então utilizados para definir uma linha de regressão. [16], neste caso, uma reta de regressão, e é avaliado o ajuste da reta aos dados experimentais.

A linearidade da resposta instrumental pode ser avaliada através de testes estatísticos, gráficos de residuais ou pelo coeficiente de correlação linear de Pearson (r).

O coeficiente de correlação linear de Pearson varia entre +1 e -1, sendo que se  $r=+1$  é descrita uma correlação linear perfeita, com declive positivo como se vê na Figura 1.3. No entanto, há que ter em atenção que esta avaliação não diz por si só se a resposta instrumental é linear pois apesar de poder ser obtido um valor elevado de r, a resposta instrumental pode não ser linear[15][14].



*Figura 1.3 - Coeficiente de correlação linear de Pearson em três situações distintas.*

Posto isto é necessário complementar a informação da correlação linear utilizando um gráfico de residuais. O gráfico de residuais não ponderado permite avaliar a linearidade da resposta instrumental assim como a homogeneidade da variância do sinal instrumental, através da observação visual da dispersão dos resultados. Este gráfico é obtido representando os valores dos residuais, calculados através da diferença entre o sinal estimado ( $\hat{y}_{ij}$ ) e o obtido ( $y_{ij}$ ), em função dos valores dos níveis de concentração[17]. De acordo com o comportamento da dispersão dos resultados podem-se tirar conclusões sobre a linearidade.

A avaliação da linearidade beneficia se esta for realizada usando critérios estatísticos para avaliar o ajuste de um modelo de regressão adequado aos dados experimentais. Quando a precisão da resposta instrumental é constante diz-se que a variância dos sinais instrumentais é homoscedástica, e deve ser testada a utilização do modelo linear não ponderado. Quando a precisão da resposta instrumental varia ao longo da gama de calibração temos uma resposta instrumental heteroscedástica o que nos remete para o modelo ponderado. Para cada tipo de dados recorrem-se a análises diferentes.

Para os dados homoscedástica recorre-se ao teste de qualidade de ajuste da ANOVA, já para os heteroscedástica recorre-se ao teste de qualidade de ajuste do  $\chi^2$  [18].

Caso se verifique uma falta de ajuste a um dos modelos pode-se remover um dos níveis de concentração (ou mais alto ou o mais baixo, desde que não se fique com menos de 4 calibradores) e avaliar se a nova gama se adequa. Caso persista, pode-se estudar uma possível adequação ao modelo quadrático. Os modelos de regressão lineares devem ser avaliados com resultados de pelo menos 4 calibradores.

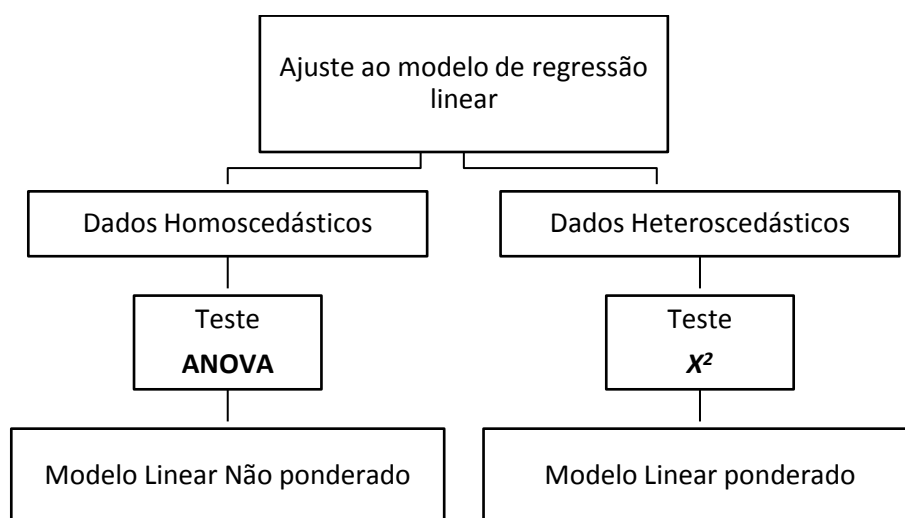


Figura 1.4 - Seleção de teste estatístico de ajuste ao modelo de regressão linear em função do comportamento da precisão da resposta instrumental.

## 1.4. Modelos de regressão

---

### 1.4.1. Modelo de regressão linear não ponderado

O modelo de regressão linear não ponderado, também conhecido como o modelo dos mínimos quadrados, assenta em três pressupostos: [19]

1. Linearidade da variação da resposta instrumental com a concentração.
2. Homogeneidade da precisão da resposta instrumental – variância homoscedástico
3. Razão das concentrações dos calibradores com incerteza desprezável considerando a precisão da resposta instrumental.

Os dois primeiros pontos já foram discutidos anteriormente. Quanto ao ponto 3, o procedimento a adotar é a elaboração de calibradores utilizando a mesma solução mãe, efetuando depois, sucessivas operações de diluição que garantam soluções de calibração com razões de concentração com incertezas desprezáveis.

Para isso começa-se por calcular a incerteza padrão relativa da razão da concentração máxima  $u'_{R\ max}$  (Equação 1.2) e assim evita-se calcular a incerteza para todas as combinações de calibradores. Utilizam-se as informações relativas à incerteza padrão máxima do material utilizado, da pipeta ( $p_{max}$ ) e do balão ( $b_{max}$ ):

$$u'_{R\ max} = \frac{u_{R\ max}}{R_{max}} = \sqrt{2 \times \left(\frac{u_{p\ max}}{p_{max}}\right)^2 + 2 \times \left(\frac{u_{b\ max}}{b_{max}}\right)^2} \quad (1.2)$$

O pressuposto sobre a qualidade dos calibradores é depois avaliado pela equação 1.3:

$$u'_{R\ max} \times 5 \leq RSD \quad (1.3)$$

Onde RSD refere-se ao desvio padrão relativo que quantifica a repetibilidade da resposta instrumental ao maior nível de concentração da gama de calibração[19], ou seja, o menor desvio padrão relativo, visto que este baixa com a concentração.

Ao assumir que a variação da resposta instrumental é linear com a concentração podemos descrever a curva de calibração pela equação 1.4:

$$y = a + bx \quad (1.4)$$

Onde  $a$  é a ordenada na origem e  $b$  o declive da curva de calibração.

Para determinar estes dois parâmetros temos as equações 1.5 e 1.6 onde [14]:

$$b = \frac{\sum_i \{(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})\}}{\sum_i (x_i - \bar{x})^2} \quad (1.5)$$

$$a = \bar{y} - b \bar{x} \quad (1.6)$$

A curva é representada por  $n$  pares ordenados  $(x_i, y_i)$  onde  $i$  varia de 1 a  $n$  (sendo  $n$  o número de pontos experimentais). O par ordenado  $(\bar{x}, \bar{y})$  que vemos nas equações anteriores representa o centróide não ponderado por onde passa sempre a linha de regressão (onde  $\bar{x}$  e  $\bar{y}$  são as médias aritméticas dos valores de  $x_i$  e  $y_i$  respetivamente) [15].

A curva de regressão descrita vai servir para estimar a concentração de amostras desconhecidas e o LOD. Para estimar a variabilidade do declive e ordenada na origem calculam-se os respetivos desvios padrão. Mas antes é necessário calcular o desvio padrão residual ( $s_{y/x}$ ), que estima os erros aleatórios na direcção da resposta instrumental. Este cálculo é dado pela equação 1.7[14][15]:

$$s_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_i (y_i - \hat{y}_i)^2}{n - 2}} \quad (1.7)$$

Tendo o desvio padrão residual pode-se então calcular o desvio padrão do declive pela equação 1.8, e da interceção pela equação 1.9:

$$s_b = \frac{s_{y/x}}{\sqrt{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}} \quad (1.8)$$

$$s_a = s_{y/x} \sqrt{\frac{\sum_i x_i^2}{n \sum_i (x_i - \bar{x})^2}} \quad (1.9)$$

Estes valores podem ser utilizados para definir os limites de confiança para o declive e a ordenada na origem, sendo que os limites para o declive da curva de regressão é



dado por  $b \pm t_{(n-2)}s_b$ , onde  $t$  representa o valor de  $t - student$  para  $n - 2$  graus de liberdade ao nível de confiança desejado. Do mesmo modo os limites para a ordenada na origem são dados por  $a \pm t_{(n-2)}s_a$ .

Com todos os parâmetros definidos já é possível obter a concentração de uma amostra desconhecida,  $x_0$ , sabendo o valor do sinal obtido experimentalmente,  $y_0$ . O cálculo da concentração engloba tanto o declive como a ordenada na origem, que estão afectados pela variabilidade descrita, bem como  $y_0$  também afectado pela resposta instrumental, portanto é também necessário o cálculo da incerteza da interpolação de  $y_0$  na curva de calibração para se estimar o valor de  $x_0$ , calculando-se assim um desvio padrão associado a  $x_0$  através da equação 1.10: [14], [15]

$$s_{x0} = \frac{s_{y/x}}{b} \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{(y_0 - \bar{y})^2}{b^2 \sum_i (x_i - \bar{x})^2}} \quad (1.10)$$

Onde  $m$  é o número de medições de  $y_0$  realizadas.

Para este caso também os limites de confiança podem ser calculados de maneira similar à descrita anteriormente, fica-se com um limite de confiança de  $x_0 \pm t_{(n-2)}s_{x0}$ .

#### 1.4.1.1. Limite de detecção e Limite de quantificação

O Limite de detecção corresponde, de acordo com o VIM[11], ao “Valor medido obtido por um dado procedimento de medição para o qual a probabilidade de afirmar falsamente a ausência de um analito num dado material é de  $\beta$ , dada uma probabilidade  $\alpha$  de afirmar falsamente a sua presença”, sendo os valores recomendados pela IUPAC para  $\beta$  e  $\alpha$  de 0,05. [11] Por outras palavras o limite de detecção é a menor quantidade de analito que produz um sinal significativamente diferente do sinal produzido na ausência deste. [15]

Este parâmetro é calculado com o desvio padrão residual, recorrendo á equação 1.11:

$$LOD = \frac{3 s_{y/x}}{b} \quad (1.11)$$

Já o limite de quantificação é a menor concentração de analito que pode ser determinada com um nível aceitável de incerteza, [16] e é calculado através da equação 1.12:

$$LOQ = \frac{10 s_{y/x}}{b} \quad (1.12)$$

#### 1.4.2. Modelo de regressão linear ponderado

O modelo da regressão linear ponderado assenta em dois pressupostos similares ao modelo não ponderado:

1. Linearidade do sinal da resposta instrumental com a quantidade estudada
2. Razão das concentrações dos calibradores com incerteza desprezável considerando a resposta instrumental.

A diferença é que os dados tratados por este modelo têm variâncias heteroscedásticas. Para confirmar o ponto 2, e sabendo que a preparação dos padrões é feita da mesma forma que no método anterior, ou seja, através de diluições sucessivas de uma solução mãe, utiliza-se a equação 1.13 [20]:

$$u'_{RAB} \leq \frac{s'_B}{3} \quad (1.13)$$

Onde  $u'_{RAB}$ , a incerteza padrão relativa associada á razão das concentrações do par de calibradores contíguos A e B, calcula-se utilizando a equação 1.14 [20]:

$$u'_{RAB} = \sqrt{(u'_{Fd(A)})^2 + (u'_{Fd(B)})^2} \quad (1.14)$$

Onde  $u'_{Fd(A)}$  e  $u'_{Fd(B)}$  correspondem ás incertezas padrão relativas dos fatores de diluição  $F_{d(A)}$  e  $F_{d(B)}$  da preparação dos respetivos calibradores. [20]

A grande diferença entre ambos os modelos reside na consideração de um fator de ponderação dos sinais obtidos a cada nível de concentração.

O fator de ponderação,  $w_i$  é calculado considerando a variação do desvio padrão da repetibilidade do sinal instrumental com a concentração estudada. Calcula-se da seguinte maneira: [14], [20]

$$w_i = \frac{s_i^{-2}}{\sum_i s_i^{-2}/n} \quad (1.15)$$

Onde  $s_i$  é o desvio padrão da repetibilidade do sinal instrumental  $i$ .

Para o presente modelo são calculados também o declive e a ordenada na origem com equações similares ao modelo não ponderado mas tendo em conta o fator de ponderação, ficando o declive (Equação 1.16) e ordenada na origem (Equação 1.17):[14], [20]

$$b_w = \frac{\sum_i w_i x_i y_i - n \bar{x}_w \bar{y}_w}{\sum_i w_i x_i^2 - n \bar{x}_w^2} \quad (1.16)$$

$$a_w = \bar{y}_w - b_w \bar{x}_w \quad (1.17)$$

Onde  $\bar{y}_w$  e  $\bar{x}_w$  são as coordenadas do centróide ponderado e são descritos pelas equações 1.18 e 1.19 respetivamente: [14], [20]

$$\bar{y}_w = \frac{\sum w_i y_i}{n} \quad (1.18)$$

$$\bar{x}_w = \frac{\sum w_i x_i}{n} \quad (1.19)$$

De seguida é necessário calcular o desvio padrão residual ponderado,  $s_{y/x_w}$  (Equação 1.20), embora este parâmetro não descreva a precisão em nenhum nível de concentração em particular, é necessário para o cálculo do desvio padrão da interpolação estatística do sinal  $\bar{y}_0$  na curva de calibração.[14], [20]

$$s_{y/x_w} = \sqrt{\frac{\sum w_i (y_i - \hat{y}_i)^2}{n - 2}} \quad (1.20)$$

O parâmetro  $\hat{y}_i$  refere-se ao sinal instrumental estimado para uma determinada concentração  $x_i$  pela curva de calibração, e pode-se calcular do seguinte modo:

$$\hat{y}_i = a_w + b_w x_i.$$

Pode-se então calcular o desvio padrão da interpolação estatística do sinal  $\bar{y}_0$  da curva de calibração: [14], [20]

$$s_{x_{0w}} = \frac{s_{y/x_w}}{b_w} \left[ \frac{1}{m w_0} + \frac{1}{n} + \frac{(\bar{y}_0 - \bar{y}_w)^2}{b_w^2 (\sum_i w_i x_i^2 - n \bar{x}_w^2)} \right]^{1/2} \quad (1.21)$$

Onde,  $m$  é o numero de replicados utilizados para estimar o sinal médio interpolado,  $\bar{y}_0$ , e  $w_0$  é o factor de ponderação associado aos sinais instrumentais únicos usados para estimar a concentração da amostra,  $\bar{q}_0$  [ $\bar{q}_0 = (\bar{y}_0 - a_w)/b_w$ ].

Este fator de ponderação,  $w_0$  é estimado a partir de modelos da variação dos desvios padrão da resposta instrumental  $s_i$  com as concentrações  $x_i$ . Na maioria dos casos  $s_i$  cresce linearmente com  $x_i$ . Também se pode estabelecer uma relação entre o desvio padrão relativo  $s'_i$  e a concentração  $x_i$ , sendo que o normal é ocorrer uma variação constante com a concentração.

Como  $w_0$  é calculado com o desvio padrão do sinal instrumental da amostra  $s_0$ , o modelo de variação  $s_i$  vs  $x_i$  ou  $s'_i$  vs  $x_i$  é usado para estimar  $s_0$ . Interpolando  $\bar{q}_0$  numa das curvas, estima-se o valor de  $s_0$  diretamente ou calculando o  $s'_0$  pela equação  $s'_0 = s_0 / \bar{q}_0$ .

Tendo os parâmetros necessários pode-se então calcular o  $w_0$  através da equação:[20]

$$w_0 = \frac{s_0^{-2}}{\sum_i s_i^{-2}/n} \quad (1.22)$$

#### 1.4.2.1. Limite de quantificação

O limite de quantificação é neste caso definido como a concentração à qual o desvio padrão relativo,  $\frac{s_{x_{0w}}}{\bar{q}_0}$ , é de 10%. Isto resulta do facto do LOQ ser definido como a quantidade dez vezes maior que o desvio padrão dos resultados de medições replicadas. Sendo portanto o coeficiente de variação do LOQ de 10% [20].

### 1.4.3. Testes de recuperação

Os testes de recuperação consistem em fortificar uma amostra com uma concentração conhecida de analito,  $c_{ad}$ , medir e calcular a percentagem de recuperação, isto é, a capacidade do método medir a concentração que foi introduzida na amostra.

Antes da fortificação deve-se analisar a amostra para ver qualquer presença de analito nativo,  $c_{nat}$ . Posteriormente, analisa-se a amostra, e de acordo com a resposta instrumental,  $c_{fort}$ , calcula-se a recuperação  $R$  (Equação 1.23),

$$R = \frac{c_{fort} - c_{nat}}{c_{ad}} \quad (1.23)$$

Esta recuperação é afetada pelas incertezas das estimativas de  $C_{fort}$ ,  $C_{nat}$  e  $C_{ad}$ , que devem ser consideradas na avaliação de desvios de  $R$  em relação ao valor de referência de  $R=1$ .

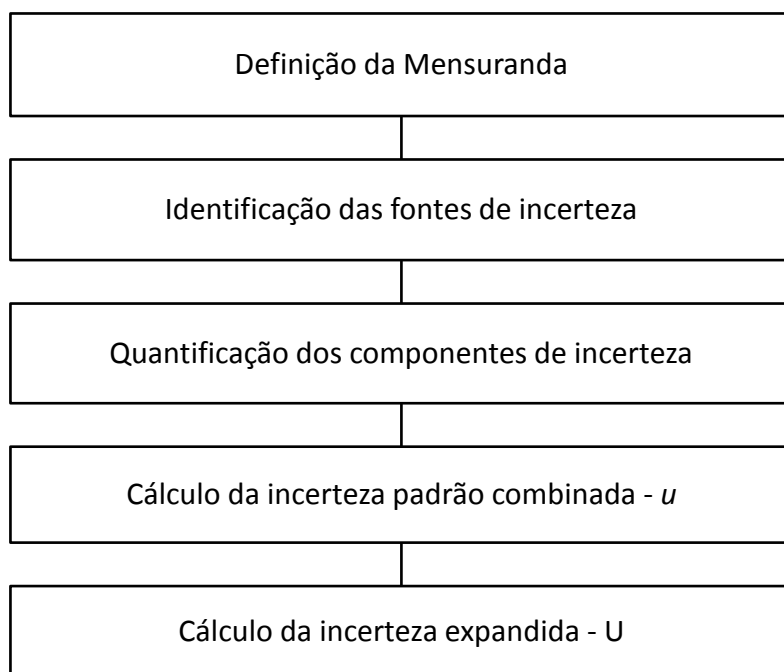
## 1.5. Incerteza da medição

---

O VIM define incerteza como “ um parâmetro não negativo que caracteriza a dispersão dos valores que são atribuídos a uma mensuranda com base nas informações utilizadas”. [11]

Para avaliar a incerteza da medição é importante avaliar todas as possíveis fontes de incerteza para que assim sejam contabilizadas.

Primeiro é importante definir a estratégia a seguir para chegar ao resultado final. É importante definir primeiro a mensuranda, para depois determinar as fontes de incerteza e quantificá-las, calculá-las, e por último expandir o nível de confiança da incerteza calculada.



*Figura 1.5 - Estratégia a seguir para chegar ao resultado final da incerteza*

Para a identificação das fontes de incerteza é usual recorrer-se a um diagrama de causa-efeito, que resume e organiza de uma maneira simples todas as fontes de incerteza. [21] Quando os componentes identificados descrevem um efeito aleatório ou sistemático separados, tendo como avaliação uma descrição detalhada do processo de medição, a avaliação da incerteza é designada de “bottom up”.

O diagrama causa-efeito também denominado por “espinha de peixe” está ilustrado na figura 1.6:

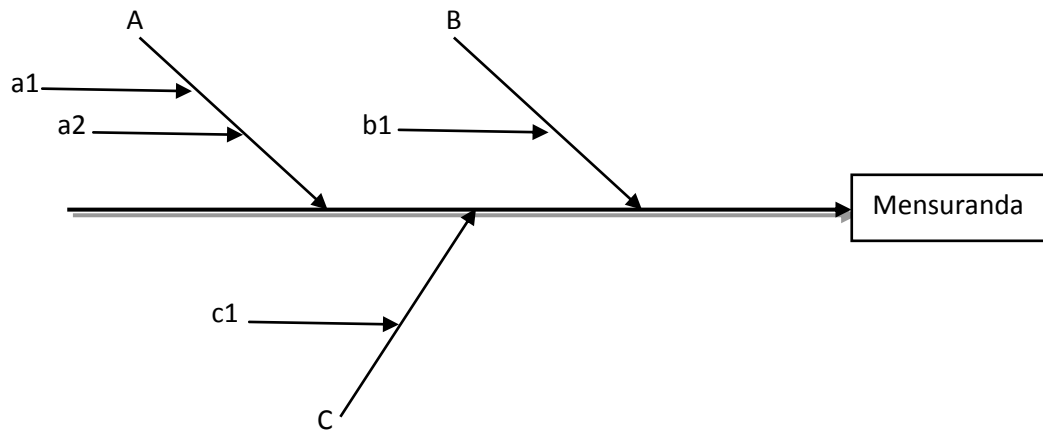


Figura 1.6 - Diagrama de causa-efeito

Onde A, B e C representam as fontes principais de incerteza, e a1, a2, b1 e c1 representam as suas componentes. [22]

Sabendo então as fontes de incerteza pode-se quantificar as mesmas associando cada uma a uma etapa analítica:

#### 1.5.1. Avaliação da incerteza associada a uma pesagem por diferença

Ao avaliar a incerteza associada a uma pesagem por diferença tem de se ter em conta as duas fontes que contribuem para a incerteza final: a repetibilidade da balança e a calibração da mesma:

$$u_m = \sqrt{2(u_{bal}^{calib})^2 + 2(u_{bal}^{rep})^2} \quad (1.24)$$

Onde  $u_{bal}^{calibração}$  é a incerteza associada à linearidade da resposta da balança, que pode ser estimada recorrendo ao valor do Erro máximo de indicação da balança, que pode ser retirado do certificado de calibração da balança, sendo então:[15]

$$u_{bal}^{calib} = \text{Erro máximo}/\sqrt{3} \quad (1.25)$$

Considerando uma distribuição retangular uniforme. Já o  $u_{bal}^{repetibilidade}$  pode ser estimado pelo desvio padrão de pesagens sucessivas. As duas componentes surgem duas vezes na equação anterior pois é considerada a pesagem das massas bruta e da tara.

### 1.5.2. Avaliação da incerteza associada a uma volumetria

Na determinação da incerteza associada à medição de um volume entram 3 componentes: Incerteza associada à calibração do material de vidro, repetibilidade da manipulação do material e efeito da temperatura, que são combinadas resultando na equação 1.26.[16], [17],[23]

$$u_v = \sqrt{(u_v^{calib})^2 + (u_v^{rep})^2 + (u_v^{temp})^2} \quad (1.26)$$

Desde já pode-se retirar o fator da temperatura, pois trata-se de um efeito desprezável comparando com as outras fontes de incerteza tendo em conta que as medições dos volumes são feitas a aproximadamente 20°C.

Os restantes componentes podem ser calculados de forma similar à anteriormente descrita. O  $u_v^{calibração}$  pode ser calculado através da tolerância associada ao valor nominal do volume do equipamento fornecido pelo fabricante. Não havendo informação do nível de confiança e distribuição associada, considera-se que o volume se rege por uma distribuição retangular uniforme.  $u_v^{calibração}$  é estimado pela razão entre a tolerância do valor nominal de volume e  $\sqrt{3}$ . [17]

A  $u_v^{repetibilidade}$  é calculada através do desvio padrão da massa de água escoada ou contida de volumetrias sucessivas visto que a densidade da água á temperatura ambiente é de aproximadamente 1 g/mL.

Fica-se então com:

$$u_v = \sqrt{(u_v^{calib})^2 + (u_v^{rep})^2} \quad (1.27)$$

Há que ter em conta também a incerteza associada a uma diluição, pois a preparação dos padrões engloba diluições, de um volume inicial  $V_i$  para um volume final  $V_f$ . A



incerteza padrão  $u_{Fv}$ , associada ao factor de diluição  $F_v$  ( $\frac{v_i}{v_f}$ ) é calculada através da equação 1.28 [15], [17].

$$\frac{u_{Fv}}{F_v} = \sqrt{\frac{(u_{vi}^{calib})^2 + (u_{vi}^{rep})^2}{v_i} + \frac{(u_{vf}^{calib})^2 + (u_{vf}^{rep})^2}{v_f}} \quad (1.28)$$

### 1.5.3. Avaliação da incerteza associada a uma quantificação instrumental

A incerteza padrão associada à quantificação de uma amostra por um método instrumental de análise,  $u_{\bar{q}_0}$ , tem em conta duas fontes, a interpolação estatística de  $\bar{y}_0$ , e a concentração dos calibradores. Caso os calibradores forem preparados através da mesma solução mãe, com incerteza desprezável, o que pode ser confirmado pela equação 1.3 ou 1.13, este componente pode tomar o valor da incerteza padrão relativa do valor da concentração da solução mãe intermédia  $u'_{si} = u'_c$ . Podem-se então combinar as componentes do seguinte modo: [20] ref falta

Para o modelo de regressão linear não ponderado:

$$u_{\bar{q}_0} = \sqrt{(u'_{inter})^2 + (u'_{si})^2} \quad (1.29)$$

Neste caso o  $u'_{inter}$ , trata-se da incerteza padrão relativa interpolada e é o mesmo que o  $s_{x0}$  já falado anteriormente (equação 1.21).

Para o modelo de regressão linear ponderado:

$$u_{\bar{q}_0} = \bar{q}_0 \sqrt{\left(\frac{s_{x0w}}{\bar{q}_0}\right)^2 + (u'_c)^2} \quad (1.30)$$

#### 1.5.4. Avaliação da incerteza associada à recuperação

A incerteza da recuperação é simples de avaliar, tendo a equação (equação 1.31), temos a incerteza dada por:

$$u'_R = \sqrt{\left(\frac{u_{c\text{ adicionada}}}{c_{\text{adicionada}}}\right)^2 + \left(\frac{u_{c\text{ estimada}}^2 + u_{c\text{ nativa}}^2}{(c_{\text{estimada}} + c_{\text{nativa}})^2}\right)} \quad (1.31)$$

Onde a  $u_{c\text{ adicionada}}$  corresponde à incerteza da adição do padrão. Por serem determinadas da mesma forma a incerteza estimada e incerteza nativa são calculadas tendo em conta a interpolação da resposta instrumental na curva de calibração.

---

## *2. Parte Experimental*

---



## 2.1. Reagentes

---

Os corantes utilizados foram obtidos comercialmente e utilizados sem nenhum processo de purificação. Foram utilizados os seguintes corantes alimentares:

- Azul Brilhante (E133); Brilliant Blue; AMRESCO Proteomics grade; Lote: 0182C360
- Preto Brilhante (E151); Brilliant Black BN (60%); Sigma-aldrich; Lote: MKBJ1099V
- Amarelo-sol (E110); Sunset yellow FCF (90%); Aldrich; Lote: MHKJ9434V
- Ponceau 4R (E124); Ponceau 4R (70%); Dr. Ehrenstorfer GmbH; Lote: 91120
- Curcumina (E100); Curcumin (80%); Merk Schuchardt; Lote: 56351554 311
- Ácido Carminico (E120); Aldrich Chem Co

0

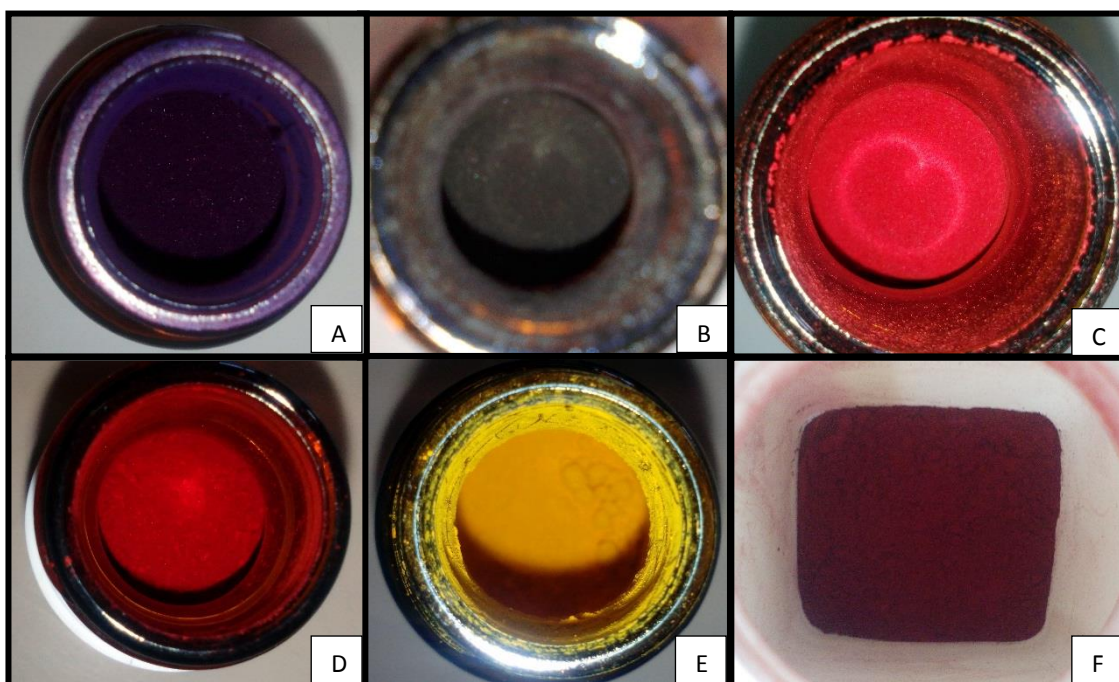


Figura 2.1 - Corantes utilizados; A) Azul Brilhante; B) Preto Brilhante; C) Amarelo sol; D) Ácido Carmínico; E) Curcumina; F) Ponceau 4R

As soluções padrão de corantes foram preparadas em Metanol/Água (50/50). O eluente utilizado na análise de HPLC foi uma mistura Metanol/ Acetato de Amónio ( pH=6,8; 20mM) de proporção variável ao longo da corrida. A variação da composição do eluente pode ser vista na tabela 2.1:

*Tabela 2.1 - Variação da composição da mistura do eluente ao longo da corrida.*

<b>Minutos</b>	<b>Acetato de Amónio (%)</b>	<b>Metanol (%)</b>
<b>0</b>	95	5
<b>6</b>	50	50
<b>10</b>	0	100
<b>12,3</b>	0	100
<b>18</b>	95	5
<b>20</b>	95	5

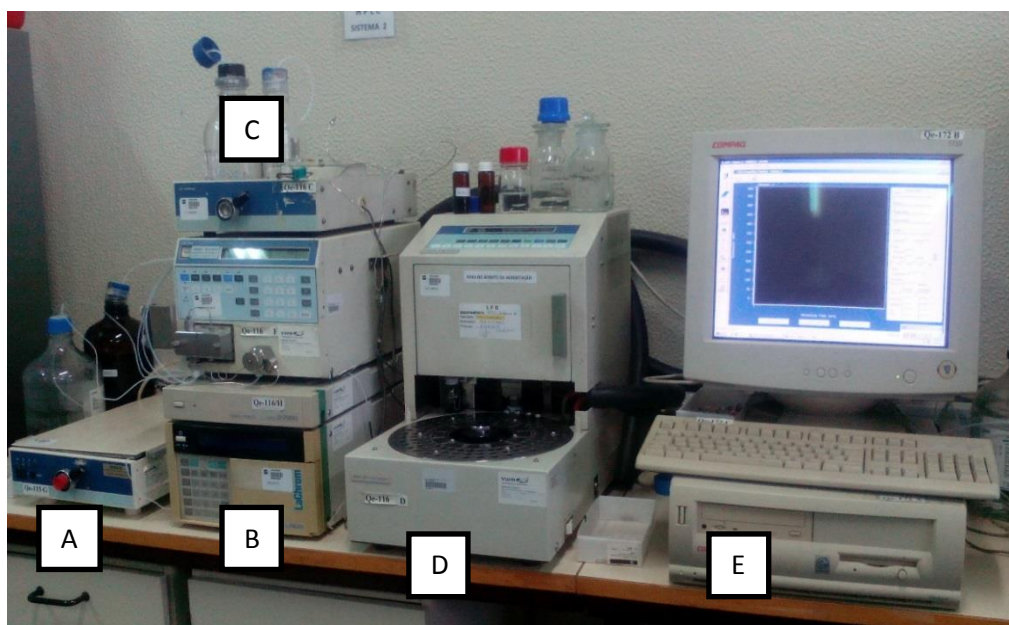
## 2.2. Material

---

No presente parágrafo são descritos os materiais e equipamentos utilizados na preparação dos padrões de calibração, padrões de controlo e na sua análise instrumental.

Na preparação dos padrões de calibração foi utilizada uma balança Metler AE 2405, com uma resolução de 0,1 mg e um alcance de 0 a 205 g, para a pesagem dos corantes, balões volumétricos de 20 mL (Duran witeg (20,000  $\pm$  0,040) mL) e de 100 mL (Duran witeg (100,000  $\pm$  0,100) mL), e uma pipeta volumétrica de 1 mL (Normax Portugal; (1,000  $\pm$  0,008) mL de classe A.

Para a análise instrumental foi utilizado um aparelho de Cromatografia Líquida de Alta performance (HPLC), acoplado a um detetor de espectrometria molecular UV-Vis. O HPLC é composto por um auto-sampler (Merk Hitachi 655<sup>a</sup>-40), uma bomba (L-6200 Intelligent pump) e um forno (Merk T-6300 Column Thermostat) para controlo de temperatura. Foi utilizada a coluna Chromalith® High resolution, 100-4,6 mm de fase reversa, as pré-colunas utilizadas foram Chromalith®, 10-4,6 mm. A recolha de dados foi feita com auxílio do software D-7000 Multi HSM Operator. A figura 2.1 ilustra a montagem do sistema de HPLC:



*Figura 2.2 - Montagem experimental do sistema HPLC; A) Forno para controlo da temperatura, B) Detetor UV/vis, C) Bomba, D) Auto-sampler e E) Sistema de aquisição para tratamento de dados.*

## 2.3. *Preparação dos Calibradores*

---

A preparação dos calibradores é feita do mesmo modo para todos os corantes. As concentrações utilizadas para os corantes Azul Brilhante, Preto Brilhante, Amarelo Sol, Ponceau 4R e Ácido Carmínico foram as mesmas. Já do corante Curcumina foram feitos calibradores com concentrações diferentes dos anteriores, embora o modo de preparação dos mesmos seja igual.

A estratégia a seguir passa pela preparação de uma solução mãe com concentração de  $100 \text{ mgL}^{-1}$  diluindo 0,0100 g de corante em 100 mL de uma mistura de água/metanol (50/50). Posteriormente, a partir da solução mãe, fazem-se as diluições necessárias para chegar às concentrações desejadas.

Os 5 corantes foram divididos em dois grupos de acordo com os comprimentos de onda ao qual absorvem radiação UV-vis. O azul-brilhante e preto-brilhante têm máximos de absorção perto dos 600 nm, já os corantes de cores vermelhas/amarelas, portanto o Ponceau 4R, Curcumina, Ácido Carmínico e Amarelo-sol, têm máximos de absorção próximos de 428 nm. Por essa razão as quantificações dos analitos foram realizadas a estes dois comprimentos de onda. Os cromatogramas de cada um dos corantes puros podem ser vistos no anexo B (da figura B.1 à figura B.5).

As condições cromatográficas foram otimizadas no laboratório antes da condução do estudo de validação da quantificação de corantes.

Tendo em atenção o tempo de retenção de cada corante nas condições cromatográficas utilizadas, concluiu-se que se podia juntar numa só solução o Azul Brilhante e o Preto Brilhante, pois o primeiro tem um tempo de retenção de aproximadamente 10,6 minutos e o preto de 6 minutos, no anexo B, figura B.6, é apresentado um cromatograma de um calibrador de  $7,5 \text{ mgL}^{-1}$  da mistura descrita.

A mesma estratégia foi seguida para preparação de soluções padrão dos restantes corantes. Como três corantes com máximos de absorção próximos de 428 nm têm tempos de retenção significativamente diferentes (curcumina (aproximadamente de 10,9 minutos), Ponceau 4R (aproximadamente de 7 minutos) e ácido carmínico (aproximadamente de 4 minutos)), e não reagem entre si em solução, optou-se por se fazer uma solução de mistura destes compostos. A combinação de analitos na mesma



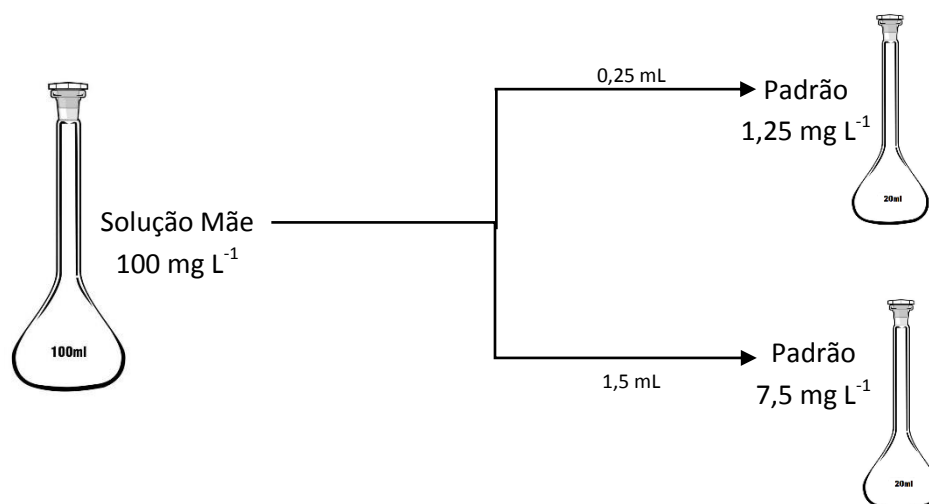
solução permitiu uma redução bastante significativa de tempo experimental. Os cromatogramas das misturas descritas podem ser consultados no anexo B, figura B.7.

## 2.4. Verificação de Homogeneidade de variâncias

---

Para o caso da verificação de homogeneidade de variâncias da resposta instrumental, onde somente são necessários os padrões com concentrações mais baixa e mais alta da gama de calibração, foram preparados padrões de  $1,25 \text{ mg L}^{-1}$  e de  $7,5 \text{ mg L}^{-1}$ . As gamas de concentração foram definidas tendo em conta os teores de corantes habitualmente observados nas amostras.

Os padrões foram preparados a partir das respetivas soluções mãe de  $100 \text{ mg L}^{-1}$ , preparadas do modo já descrito anteriormente, retirando-se um volume calculado, para um balão de 20 mL: para a solução de  $1,25 \text{ mg L}^{-1}$  foram necessários 0,25 mL da solução mãe, já para a de  $7,5 \text{ mg L}^{-1}$  foram necessários 1,5 mL.



*Figura 2.3 - Estratégia de preparação dos calibradores para a avaliação da homogeneidade de variâncias da resposta instrumental*

Imagem do balão adaptado de mcintifica, 2015

Preparados os padrões prosseguiu-se para a quantificação instrumental por HPLC-UV/vis.

Após obtidos os primeiros cromatogramas constatou-se que o pico do ácido carmínico era demasiado pequeno. Perante a situação decidiu-se aumentar a concentração do

ácido carmínico na solução mãe, passando de  $100 \text{ mg L}^{-1}$  para  $250 \text{ mg L}^{-1}$ . Após novas medições os resultados não foram satisfatórios sendo que o pico continuava a sair pequeno com má resolução. Constatou-se que mesmo diluindo um pouco de corante sem concentração definida para que a solução ficasse com apenas ácido carmínico o resultado era na mesma um pico demasiado pequeno e mal definido. Perante estas dificuldades decidiu-se trocar de corante, para Amarelo-sol, pois apresenta, tal como os outros, limites legais e é bastante utilizado. Esta troca foi feita para que o trabalho pudesse prosseguir, ficando a avaliação do caso do ácido carmínico para um futuro trabalho, visto que precisa de ser alvo de estudo para saber quais as melhores condições a adotar, quer na preparação de padrão quer na sua análise.

## 2.5. Curva de calibração

---

Para traçar a curva de calibração foi necessário fazer 5 padrões de calibração, com uma gama compreendida entre  $1,5 \text{ mg L}^{-1}$  e  $7,5 \text{ mg L}^{-1}$ .

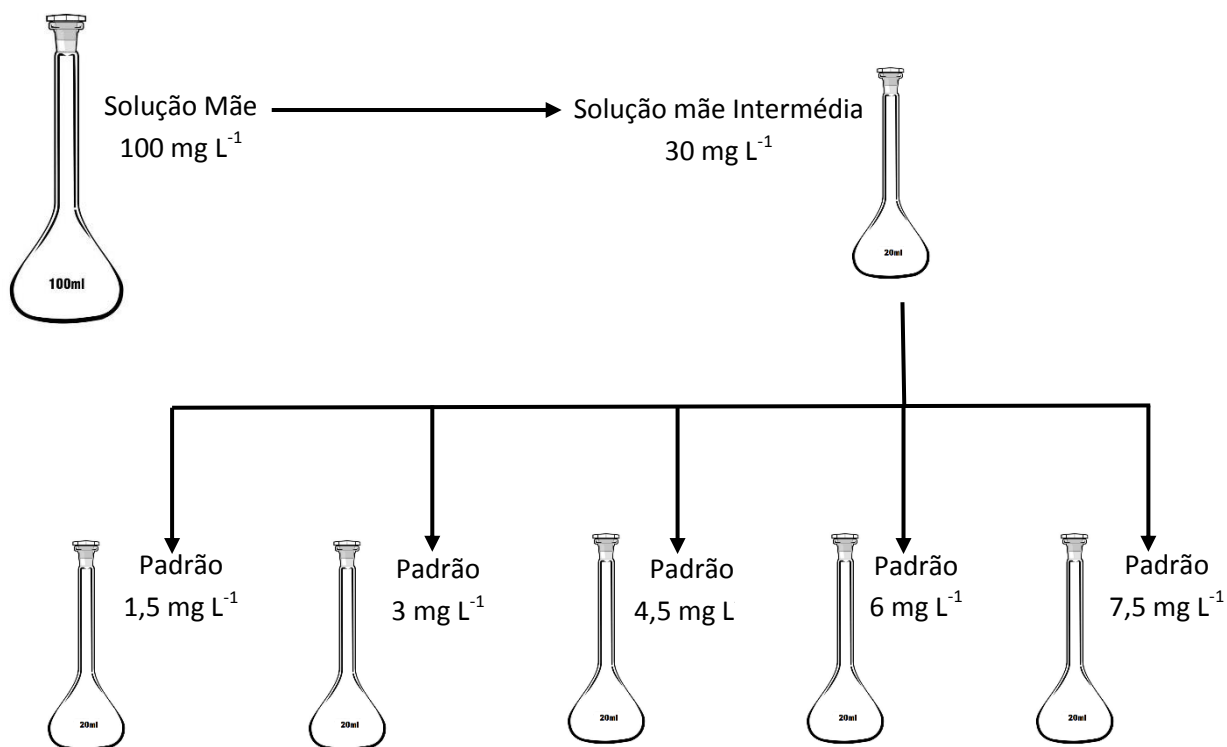
De maneira a minimizar a incerteza relativa da razão das concentrações dos vários pares de calibradores para cumprimento dos pressupostos do modelo de regressão usado, foi definida uma estratégia de diluição da solução mãe em que as tomas desta solução são realizadas com a mesma pipeta medindo o mesmo volume. A medição de diferentes volumes da solução mãe foi realizada por repetição de tomas do mesmo volume da solução mãe. Esta prática teve como objetivo eliminar a incerteza da tolerância do valor nominal do volume da pipeta do cálculo da razão da concentração dos vários calibradores; a razão das concentrações dos calibradores deixa assim de ser função de efeitos sistemáticos que afetam o valor nominal da pipeta.

Deste modo estabeleceu-se uma gama de concentração, com 5 pontos composta por:  $1,5 \text{ mg L}^{-1}$ ;  $3 \text{ mg L}^{-1}$ ;  $4,5 \text{ mg L}^{-1}$ ;  $6 \text{ mg L}^{-1}$  e  $7,5 \text{ mg L}^{-1}$ .

Preparando uma solução mãe de  $100 \text{ mg L}^{-1}$ , e a partir desta uma solução intermédia com concentração de  $30 \text{ mg L}^{-1}$ , permite-se que os volumes a retirar desta última para cada padrão de calibração sejam os seguintes:

*Tabela 2.2 - Volume de solução mãe utilizado para fazer os corantes aos 5 níveis de quantidade*

Concentração ( $\text{mg L}^{-1}$ )	Volume adicionado de solução mãe (mL)
1,5	1
3	2
4,5	3
6	4
7,5	5



*Figura 2.4 - Ilustração da preparação dos calibradores*

Após realizadas as medições viu-se que era necessário alargar a gama de concentração dos calibradores de Curcumina, e de modo à etapa de diluição da solução intermédia ser semelhante à anteriormente descrita preparou-se uma solução intermédia de 60 mg/L que permitiu a preparação de calibradores com as seguintes concentrações: 3 mg/L; 6 mg/L; 9 mg/L; 12 mg/L e 15 mg/L. O modo de preparação dos padrões é igual ao descrito para os outros padrões, pelo que o volume a adicionar para cada padrão pode ser visto na tabela 2.2.

Finda a preparação dos calibradores procedeu-se à leitura do sinal instrumental por HPLC-UV/Vis, que consiste na calibração da gama de trabalho descrita.

---

### *3. Tratamento e Discussão de Resultados*

---

Neste capítulo irão ser apresentados e discutidos os resultados obtidos para os corantes estudados. Foram determinadas as homogeneidades de variâncias e linearidade do sinal instrumental, limites de quantificação e detecção (LOQ e LOD respetivamente), recuperação de analito em amostras reais e incerteza da medição.

### 3.1. Calibradores

---

Os calibradores foram preparados como já descrito anteriormente.

Para verificar o pressuposto do modelo de regressão que assume que a razão das concentrações dos calibradores têm incertezas padrão relativas,  $u'_R$ , desprezáveis considerando a repetibilidade relativa da resposta instrumental, RSD, calcula-se a incerteza padrão relativa máxima da razão de concentrações de calibradores,  $u'_{R\max}$ .

Para calcular  $u'_{R\max}$  são necessários os valores das repetibilidades da manipulação da pipeta e do balão utilizados. Estes valores foram calculados pelo desvio padrão da massa de água escolada pela pipeta ou contida no balão em operações sucessivas cujos valores podem ser consultados no Anexo B (Tabela B.1 e B.2). O desvio padrão da massa de água é equivalente ao desvio padrão do volume visto que a densidade da água é aproximadamente  $1 \text{ g mL}^{-1}$ .

Com os valores obtidos calcula-se então a incerteza padrão associada quer à pipeta (equação 3.1) quer ao balão (equação 3.2).

(3.1)

$$u_p = \sqrt{\left(\frac{tol}{\sqrt{6}}\right)^2 + (rep)^2}$$

(3.2)

$$u_b = \sqrt{\left(\frac{tol}{\sqrt{6}}\right)^2 + (rep)^2}$$

Utilizando a equação 1.13 obtém-se um valor para  $u'_{R\max}$  de 1,171 %. Na tabela 3.1 podemos comparar o valor de  $u'_{R\max}$  com os valores de RSD/3 do calibrador do mais alto nível de concentração da gama de calibração (15 mg/L no caso da Curcumina e 7,5

mg/L no caso dos restantes corantes). Para que seja confirmado o pressuposto, é necessário que  $u'_{R\max}$  seja menor ou igual a  $RSD/3$ .

*Tabela 3.1- Valores para avaliação do pressuposto do modelo de regressão sobre a qualidade dos calibradores.*

Corante	$u'_{R\max}$	RSD/3
Curcumina	1,171 %	1,56%
Azul Brilhante		0,75%
Preto Brilhante		1,24%
Ponceau 4R		1,94%
Amarelo-sol		1,38%

Como se pode confirmar pelos valores acima apresentados, o pressuposto do modelo de regressão parece ser válido para todos os corantes exceto para o azul brilhante. No entanto, o pressuposto do modelo de regressão pode ser considerado válido também para o azul brilhante se  $u'_{R\max}$  for estatisticamente equivalente a  $RSD/3$ . Esta equivalência é testada recorrendo a um teste F bilateral que consiste no cálculo do valor de  $F_{cal}$  pela equação 3.3 e a comparação deste com um valor crítico da distribuição F para um número elevado de graus de liberdade associado a  $u'_{RAB}$  (ex. 50) e os graus de liberdade de RSD.

$$F_{cal} = \frac{u'_{RAB}}{RSD/3} \quad (3.3)$$

Esta avaliação foi realizada para um nível de confiança de 99%.

Os resultados obtidos para a curcumina foram os seguintes:

$$F_{cal} = \left[ \frac{u'_{RAB}}{RSD/3} \right]^2 = \left[ \frac{1,171\%}{0,75\%} \right]^2 = 2,43$$

$F_{tab} = 5,45$  ; para 99 % de nível de confiança

Como se pode verificar o  $F_{cal}$  é inferior ao  $F_{tab}$ , pelo que se constata que a metodologia seguida para preparação dos calibradores de curcumina cumpre com os pressupostos do modelo de regressão sobre a qualidade dos calibradores.



### 3.2. Avaliação da ocorrência de valores aberrantes

---

Antes de se avaliar a homogeneidade de variâncias dos sinais instrumentais, é importante avaliar a ocorrência de valores aberrantes nos dados.

Para isso é utilizado o Teste de Grubbs de valores aberrantes únicos, que é recomendado pela ISO. Este teste compara o módulo da diferença do valor máximo ou mínimo,  $x_{est}$ , da média da amostra,  $\bar{x}$ , com o desvio padrão,  $s$ , da amostra através da razão apresentada na equação 3.4.[14], [17]

$$T_{cal} = \frac{|x_{est} - \bar{x}|}{s} \quad (3.4)$$

Neste teste o  $T_{cal}$  é comparado com um valor máximo tabelado para o número de réplicas e nível de confiança desejado (Anexo B tabela 6.3). Caso o valor de  $T_{cal}$  seja maior que o valor tabelado estamos perante um valor aberrante único.[14]

Para o caso do Amarelo sol foi detetado um valor aberrante único. Eliminado este valor aberrante único as restantes réplicas não apresentaram valores aberrantes. O mesmo se verificou para o Ponceau 4R, que apresentou um valor aberrante único.

### 3.3. Homogeneidade de variâncias

---

A homogeneidade de variâncias é verificada calculando a razão,  $F_{cal}$ , entre as variâncias do sinal instrumental observado ao nível de concentração mais alto,  $s_2^2$ , e mais baixo,  $s_1^2$ , equação 3.5, e comparando este último com um valor crítico,  $F_{tab}$ , para um nível de confiança de 99 % e o número de graus de liberdade das duas variâncias. Habitualmente  $s_2^2$  é superior a  $s_1^2$ .

$$F_{cal} = \frac{s_2^2}{s_1^2} \quad (3.5)$$

Considera-se que a variância da resposta instrumental é homogênea quando  $F_{tab}$  é superior ao  $F_{cal}$ .

Perante os resultados obtidos ( Anexo B, Tabela 6.3 à 6.8) pode-se calcular as variâncias e a partir destas o valor de  $F_{cal}$ .

Exemplificando os cálculos para o caso do Azul Brilhante temos em primeiro lugar o cálculo do desvio padrão:

$$s_i = \sqrt{\frac{\sum_i (y_{ij} - \bar{y}_i)^2}{n - 1}} \quad (3.6)$$

Com a equação 3.6 obtemos os seguintes resultados:

$$s_1 = 2753,153 \text{ u.a. (unidade arbitrárias de área de pico de Azul Brilhante)}$$

$$s_2 = 14866,06 \text{ u.a.}$$

Sabendo que a variância corresponde ao quadrado do desvio padrão temos:

$$s_1^2 = 7579850.722 \text{ (u.a.)}^2$$

$$s_2^2 = 220999864.04 \text{ (u.a.)}^2$$

Calculando o valor de  $F_{cal}$ :

$$F_{cal} = \frac{220999864,04}{7579850,722} = 29,156$$

Sabendo que o valor de  $F_{tab}$  é 6,541 para um nível de confiança de 99 % e 9 graus de liberdade do numerador e denominador, conclui-se que neste caso não existe homogeneidade na precisão da resposta instrumental pois  $F_{cal}$  é maior que o  $F_{tab}$ .

Na tabela 3.2 podem-se ver os valores de  $F_{cal}$  e  $F_{tab}$  obtidos para os restantes corantes. Os resultados experimentais relativos à verificação de homogeneidade de variâncias encontram-se no Anexo C (da tabela C.4 à C.7) .

*Tabela 3.2 - Valores de  $F_{cal}$  e  $F_{tab}$  para avaliação da variação da precisão da resposta instrumental na gama de calibração*

<b>Corante</b>	<b><math>F_{tab}</math></b>	<b><math>F_{cal}</math></b>	<b>Conclusão</b>
<b>Azul Brilhante</b>	6,541	29,156	Não homogéneo
<b>Preto Brilhante</b>		20,991	Não homogéneo
<b>Curcumina</b>		1,790	Homogéneo
<b>Amarelo-sol</b>		23,909	Não homogéneo
<b>Ponceau 4R</b>		39,566	Não homogéneo

Perante os resultados obtidos foi possível escolher o tipo de modelo a seguir. No caso da Curcumina, como se observou uma homogeneidade da variância da precisão da resposta instrumental, decidiu-se prosseguir com a avaliação da adequação do modelo da regressão linear não ponderado. Quanto aos restantes corantes, como não se verificou uma homogeneidade de variância da resposta instrumental, optou-se por estudar a aplicabilidade do modelo de regressão linear ponderado.

### 3.4. Linearidade

Para avaliar a linearidade foram estudados os sinais a 5 níveis de concentração recolhendo-se 5 replicados por nível de concentração em condições de repetibilidade.

A avaliação inicial da linearidade da resposta instrumental envolveu o cálculo do quadrado do coeficiente de correlação linear de Pearson,  $R^2$ , e a construção de gráficos da curva de calibração e dos residuais da regressão.

As curvas de calibração obtidas para os corantes em estudo são representadas na

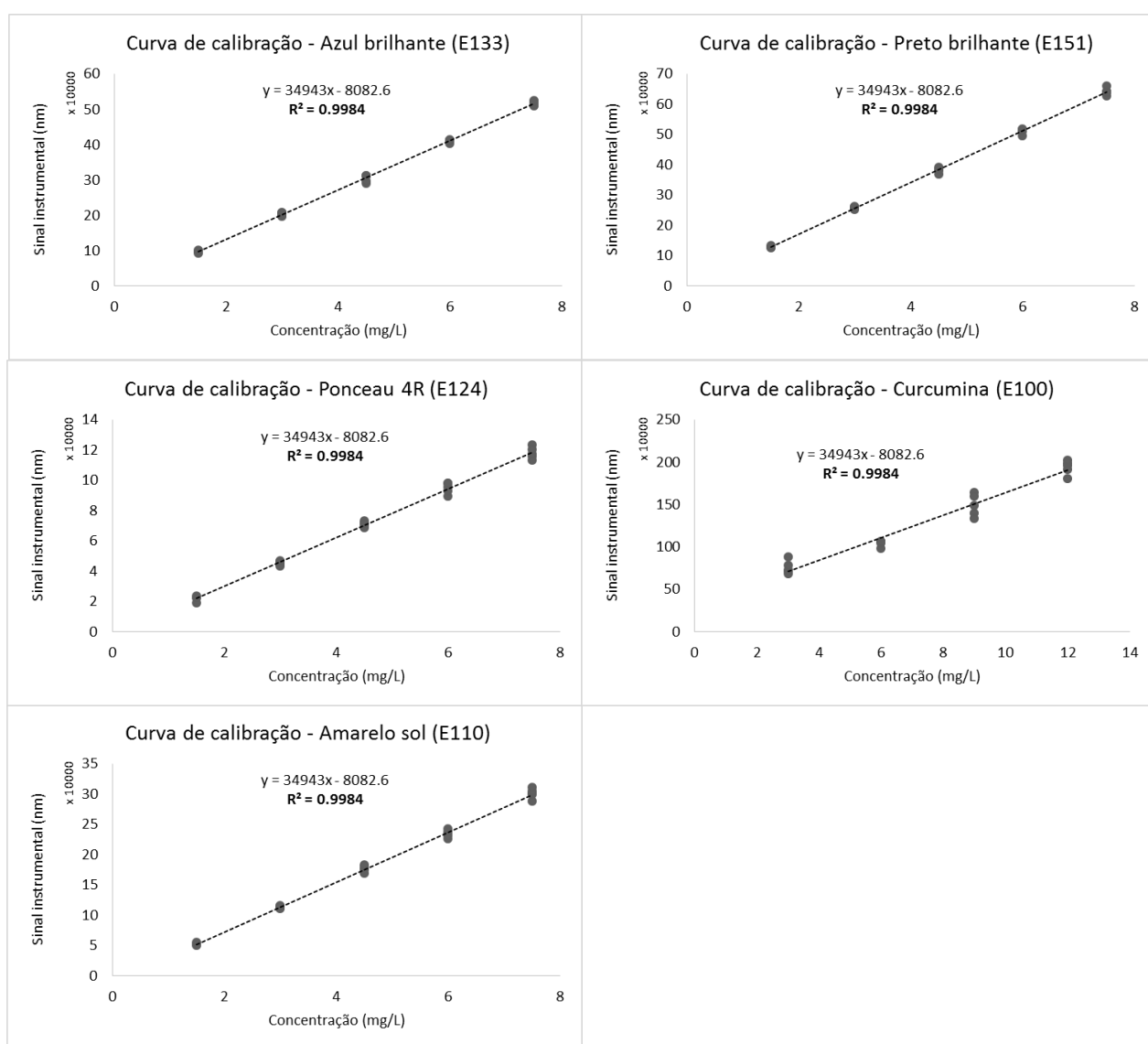


Figura 3.1 - Curvas de calibração obtidas considerando sinais de 5 níveis de concentração de cada corante

figura 3.1:

A avaliação visual da linearidade da resposta instrumental é mais fácil através da construção de gráficos de residuais (Figura 3.2).

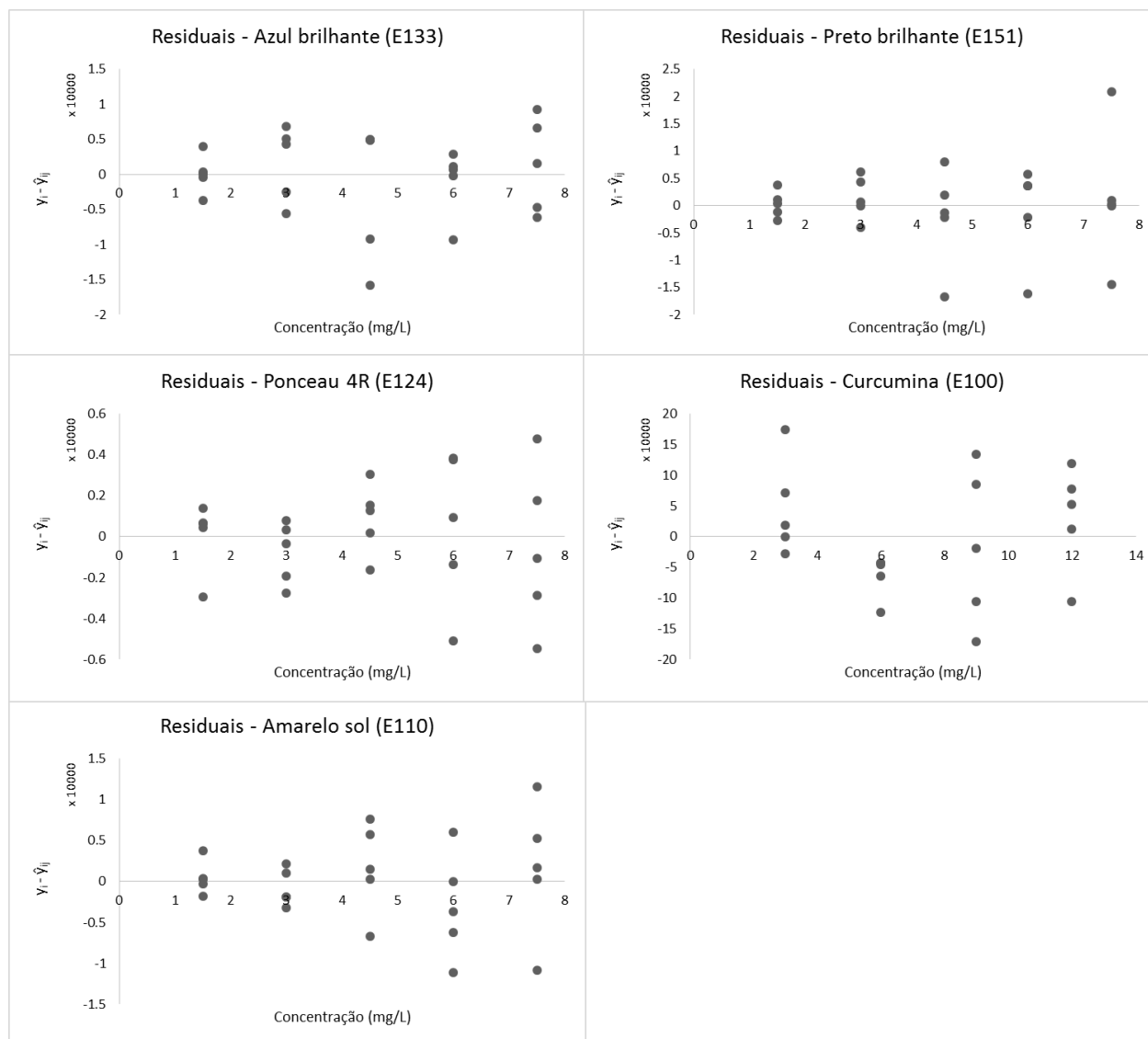


Figura 3.2 - Residuais obtidos considerando sinais de 5 níveis de concentração de cada corante

Pela observação dos gráficos acima representados pode-se concluir que para os corantes: azul brilhante, preto brilhante, amarelo sol e Ponceau 4r a resposta instrumental apresenta uma boa linearidade com a concentração. O mesmo não se observa para a curcumina para toda a gama: obtém-se um valor de  $r$  demasiado baixo e esta falta de linearidade pode ser confirmada pelo gráfico de residuais. Quando se retiram os pontos relativo ao último nível de concentração verifica-se uma melhoria

## 3.5. Ajuste ao modelo de regressão

---

### 3.5.1. Modelo de regressão linear não ponderado

Os resultados do estudo da homogeneidade de variâncias da resposta instrumental permitem definir o tipo de modelo de regressão a usar: não ponderado ou ponderado. Posteriormente, é necessário avaliar o ajuste do modelo específico que se pretende utilizar. Assim, para dados homoscedásticos (i.e. com variância constante da resposta instrumental) pode ser, por exemplo, avaliado a ajuste do modelo linear ou quadrático não ponderado.

Para avaliar a qualidade do ajuste do modelo de regressão aos dados experimentais procede-se a uma avaliação estatística do ajuste. Para avaliar a qualidade do ajuste do modelo de regressão linear não ponderado utiliza-se o teste ANOVA-LOF (ANOVA – Análise de variância; LOF – “lack-of-fit”). Para a avaliação do modelo de regressão linear ponderado utiliza-se um teste Chi-Quadrado ( $\chi^2$ ).

O ajuste do modelo de regressão linear não ponderado aos dados experimentais da curcumina é realizado através de um teste ANOVA-LOF que será descrito.

No teste ANOVA-LOF considera-se um conjunto de pares ordenados  $(x_{ij}, y_{ij})$ , sendo  $x$  a concentração e  $y$  a resposta instrumental (sinal),  $i$  o nível de concentração estudado variando de 1 a  $n$ , e  $j$  o índice do replicado de cada valor de  $x_i$  variando de 1 a  $k$ .

Primeiro é determinada a soma dos quadrados dos residuais que possui  $np-2$  graus de liberdade, dada pela equação 3.7: [15], [18]

$$SS_r = \sum_{ij} (y_{ij} - \hat{y}_i)^2 \quad (3.7)$$

Onde  $y_{ij}$  é a replica  $j$  da leitura do calibrador com concentração  $x_i$  e  $\hat{y}_i$  é o sinal estimado pela linha de regressão para  $x_i$  ( $\hat{y}_i = a + bx_i$ ; em que  $a$  e  $b$  representam a ordenada na origem e declive da linha de regressão).

Esta soma dos quadrados dos residuais pode ser dividida em dois termos: a soma dos quadrados do erro puro que possui  $n(k-1)$  graus de liberdade, dada pela equação 3.8, e

a soma dos quadrados relativa à falta de ajuste do modelo que tem  $n-2$  graus de liberdade e pode ser estimada por diferença através da equação 3.9:

$$SS_E = \sum_{ij} (y_{ij} - \bar{y}_i)^2 \quad (3.8)$$

$$SS_{lof} = SS_r - SS_E \quad (3.9)$$

Finalmente são calculadas as razões das somas dos quadrados com o respectivo número de graus de liberdade, tanto para erro puro (equação 3.10) como para a falta de ajuste (equação 3.11), que correspondem às variâncias introduzidas nos dados por estes dois efeitos:

$$MS_E = \frac{SS_E}{n(k-1)} \quad (3.10)$$

$$MS_{lof} = \frac{SS_{lof}}{n-2} \quad (3.11)$$

A qualidade do ajuste do modelo de regressão é então verificado comparando o valor da razão de  $MS_{lof}/MS_E$ , designado  $F_{cal}$ , (equação 3.12) com o valor crítico da distribuição F,  $F_{tab}$ , para os graus de liberdade das duas variâncias.

$$F = \frac{MS_{lof}}{MS_E} \quad (3.12)$$

De seguida descreve-se a aplicação do teste ANOVA-LOF aos sinais da curcumina.

Os cálculos foram realizados com recurso a elaboração de uma folha de cálculo excel, obtendo os seguintes resultados:

$SS_r = 1,10 \times 10^{12}$ , para 23 graus de liberdade

$SS_E = 1,40 \times 10^{11}$ , para 20 graus de liberdade.

$SS_{lof} = 9,62 \times 10^{11}$ , para 3 graus de liberdade.

Calculando as respectivas variâncias obtêm-se:

$$MS_E = 7,00 \times 10^9$$

$$MS_{lof} = 3,21 \times 10^{11}$$

Finalmente obteve-se um valor de  $F_{cal}$  de 45,86 que é comparado com o valor  $F_{tab}=F_{3,20}=(F_{n-2, n(p-1)})=4,94$  para um nível de confiança de 99 %. Como  $F_{cal}$  é superior ao  $F_{tab}$  conclui-se que o modelo de regressão não é adequado para descrever a variação do sinal instrumental com a concentração na gama estudada.

Perante estes resultados decidiu-se eliminar o ultimo nível de concentração e avaliar o ajuste do modelo perante 4 níveis de concentração; o número mínimo de níveis de concentração para uma adequada utilização de modelos de regressão lineares [15].

Os resultados obtidos para 4 níveis de concentração foram os seguintes:

$$SS_r = 1,62 \times 10^{-11}, \text{ para 18 graus de liberdade}$$

$$SS_E = 1,25 \times 10^{11}, \text{ para 16 graus de liberdade.}$$

$$SS_{lof} = 3,76 \times 10^{10}, \text{ para 2 graus de liberdade.}$$

$$MS_E = 7,78 \times 10^9$$

$$MS_{lof} = 1,88 \times 10^{10}$$

Calculando o valor de  $F_{cal}$  obtemos 2,417, já o tabelado,  $F_{tab}$ , é 6,226. Verifica-se então que para 4 níveis de concentração o modelo linear não ponderado descreve adequadamente a variação do sinal nesta gama de concentração mais estreita.

### 3.5.2. *Modelo de regressão linear ponderado*

Para avaliar o ajuste do modelo de regressão linear ponderado aos sinais dos restantes corantes utilizou-se o teste do  $\chi^2$ .

Este teste é em grande parte semelhante ao descrito anteriormente, tendo como diferença o facto de ser considerado um fator de ponderação,  $w_i$ , no cálculo das variâncias função da precisão dos sinais.



Neste caso considera-se mais uma vez um conjunto de pares ordenados  $(x_{ij}, y_{ij})$ , sendo  $x$  a concentração e  $y$  a resposta instrumental (sinal),  $i$  o nível de concentração estudado que varia de 1 a  $n$ , e  $j$  o índice do replicado de cada valor de  $x_i$ , variando de 1 a  $k$ .

Determina-se primeiro a soma ponderada dos quadrados dos residuais, dada pela equação 3.13:

$$SS_{(w)r} = \sum_{ij} w_i (y_{ij} - \hat{y}_i)^2 \quad (3.13)$$

Onde  $w_i$  é o factor de ponderação para o nível de concentração  $i$  estimado para a regressão ponderada (equação 1.15) e  $\hat{y}_i$  é o sinal estimado pela linha de regressão ponderada para a concentração  $x_i$ .

O  $\hat{y}_i$  é obtido através da equação 3.14 em que  $a_w$  e  $b_w$  são as ordenada na origem e declive estimados pelo modelo linear ponderado.

$$\hat{y}_i = a_w \times x_i + b_w \quad (3.14)$$

Os parâmetros da reta de regressão são calculados utilizando as equações 1.16 e 1.17. A soma ponderada dos quadrados dos residuais,  $SS_{(w)r}$ , também é dividida em duas componentes: a soma ponderada dos quadrados do erro puro (equação 3.15) e a soma ponderada dos quadrados de desvios atribuídos à falta de ajuste (equação 3.16):

$$SS_{(w)E} = \sum_{ij} w_i (y_{ij} - \bar{y}_i)^2 \quad (3.15)$$

$$SS_{(w)lof} = SS_{(w)r} - SS_{(w)E} \quad (3.16)$$

A falta de ajuste é avaliada do mesmo modo que no teste estatístico anterior, através da razão entre  $MS_{lof}$  (equação 3.17) e  $MS_E$  (equação 3.18) que quantificam a variância nos dados associada aos erros experimental puro e falta de ajuste do modelo de regressão respetivamente.

$$MS_{(w)E} = \frac{SS_{(w)E}}{n(k-1)} \quad (3.17)$$

$$MS_{(w)lof} = \frac{SS_{(w)lof}}{n - 2} \quad (3.18)$$

O valor obtido da razão  $MS_{(w)lof}/MS_{(w)E}$ , designado  $F_{(w)cal}$ , é então comparado com o valor crítico da distribuição F,  $F_{tab}$ , tabelado para os graus de liberdade respetivos das variâncias [(n-2) e n(k-1)]. Caso  $F_{(w)cal}$  seja inferior a  $F_{tab}$  conclui-se que o modelo de regressão linear ponderado é adequado definir um modelo de variação do sinal com a concentração.

Para este trabalho avaliou-se o ajuste do presente modelo aos sinais do HPLC-UV/Vis obtidos para quatro corantes: azul-brilhante, preto-brilhante, amarelo-sol e ponceau 4R.

De seguida apresentam-se os cálculos da avaliação do ajuste do modelo linear ponderado aos sinais do azul-brilhante:

$$SS_{(w)r} = 4,06 \times 10^8, \text{ com 23 graus de liberdade}$$

$$SS_{(w)E} = 3,89 \times 10^8, \text{ com 20 graus de liberdade.}$$

$$SS_{(w)lof} = 1,66 \times 10^7, \text{ com 3 graus de liberdade.}$$

Calculando as variâncias obtém-se:

$$MS_{(w)E} = 1,95 \times 10^7$$

$$MS_{(w)lof} = 5,52 \times 10^6$$

Por fim a razão  $F_{cal} (MS_{(w)lof}/MS_{(w)E}=0,28)$  é comparada com o valor crítico  $F_{tab} (F_{3,20} = (F_{n-2, n(p-1)})=4,94)$  definido para um nível de confiança de 99 %.

Tendo em conta que  $F_{cal}$  é menor que  $F_{tab}$ , concluindo-se o modelo de regressão linear ponderado é adequado para descrever a variação do sinal instrumental do azul-brilhante na gama de calibração estudada.

Para os restantes corantes foram realizados os cálculos do mesmo modo aqui descrito. Os sinais experimentais reunidos para esta avaliação bem como os parâmetros relevantes calculados estão apresentados no Anexo C.

A tabela 3.3 apresenta os valores de  $F_{cal}$  e  $F_{tab}$  desta avaliação que permitem facilmente concluir sobre a adequação o modelo de regressão estudado.

Tabela 3.3 – Valores de  $F_{cal}$  e  $F_{tab}$  usados na avaliação do ajuste do modelo de regressão linear ponderado aos sinais dos analitos estudados

Corante	$F_{tab}$ $F_{3,20}=(F_{n-2, n(p-1)})$	$F_{cal}$
Azul Brilhante	4,94	0,28
Preto Brilhante		0,34
Ponceau 4R		0,87
Amarelo-sol		0,80

Para todos os corantes estudados, conclui-se que o modelo de regressão linear ponderado é adequado para a calibração do HPLC-UV/Vis nas gamas estudadas.

### *3.6. Calibração por regressão não ponderada para a determinação da concentração de uma amostra desconhecida.*

---

Para o caso da curcumina a calibração do HPLC-UV/Vis baseou-se numa regressão não ponderada para a qual foi desenvolvida uma folha de cálculo onde também são realizados todos os cálculos necessários para se estimar a concentração de um material de referência (ex. padrão de controlo) ou de uma amostra desconhecida. Esta folha de cálculo estima a incerteza das medições.

Os cálculos iniciam-se com a determinação dos parâmetros da linha de regressão, ou seja a ordenada na origem e o declive. Estes parâmetros são calculados utilizando as equações 1.6 e 1.7 respetivamente.

Tendo os parâmetros da linha de regressão é possível então determinar a concentração de uma amostra desconhecida através da equação 1.4.

Em rotina é necessário realizar uma calibração diária recorrendo à leitura duplicada dos calibradores. A qualidade da calibração é avaliada através do valor do coeficiente

de correlação linear de Pearson,  $R$ , ou do seu quadrado,  $R^2$ , e de resultados da análise de padrões de controlo da calibração.

O  $R$  ou  $R^2$  devem ser superiores a 0,999 ou 0,998 respetivamente. Tendo em conta que já foi comprovada a linearidade da resposta instrumental, os  $R$  ou  $R^2$  são usados para detetar desvios aberrantes nos sinais dos calibradores.

São quantificados padrões de controlo, de preparação independente dos calibradores, para avaliar o desempenho da calibração. Os calibradores e padrões de controlo foram preparados a partir da mesma substância de referência visto que as referências usadas têm qualidade comprovada e são conservados e manipulados de forma adequada.

A qualidade da quantificação dos padrões de controlo é avaliada através do estudo da compatibilidade metrológica entre as concentrações conhecida,  $C_{ref}$  (i.e. de referência) e estimadas,  $C_{obt}$ , (i.e. obtida) dos padrões de controlo [11]. A equação 3.16 é usada na avaliação da compatibilidade.

$$|C_{obt} - C_{ref}| \leq k \times \sqrt{u_{dif}} \quad (3.19)$$

A  $u_{dif}$  é a incerteza padrão da diferença entre a  $C_{ref}$  e a  $C_{obt}$  dada pela equação 3.20:

$$u_{dif} = \sqrt{u_{ref}^2 + u_{obt}^2} \quad (3.20)$$

Em que  $u_{ref}$  e  $u_{obt}$  são as incertezas padrão associadas a  $C_{ref}$  e  $C_{obt}$  respetivamente.

A  $u_{ref}$  é calculada pela equação 3.21, que corresponde à combinação da incerteza padrão relativa das variáveis usadas no cálculo de  $C_{ref}$ .

$$u_{ref} = C_{ref} \sqrt{\left(\frac{u_m}{m}\right)^2 + \left(\frac{u_b}{v_b}\right)^2 + \left(\frac{u_p}{v_p}\right)^2 + \left(\frac{u_{pur}}{pur}\right)^2 + \left(\frac{u_{fd}}{fd}\right)^2} \quad (3.21)$$

Onde  $u_b$  e  $u_p$  se referem á incerteza padrão do volume (balão e pipeta respetivamente) e  $v_b$  e  $v_p$  são os volumes,  $u_{pur}$  refere-se á incerteza padrão associada á pureza do material ( $pur$ ).

Quando os calibradores e padrões de controlo são obtidos a partir da mesma substância de referência, o termo  $(u_{pur}/pur)$  é considerado igual a zero visto que pureza não afeta a diferença de  $(C_{obt}-C_{ref})$ .

Na folha de cálculo desenvolvida é também calculado o desvio padrão residual, que vai ser utilizado para o cálculo do LOD e LOQ como descrito nas equações 1.11 e 1.12 respetivamente.

### 3.6.1. Incerteza associada à concentração estimada por HPLC-UV/Vis

Para calcular a incerteza padrão relativa,  $u'_q$ , associada à concentração determinada experimentalmente, utiliza-se a equação 3.22.

$$u'_q = \sqrt{(u'_{inter})^2 + (u'_{sol.m\tilde{a}e})^2} \quad (3.22)$$

Onde  $u'_{inter}$  é a incerteza padrão relativa associada à interpolação estatística do sinal do item analisado na curva de calibração estimada utilizando a equação 1.21, e  $u'_{sol.m\tilde{a}e}$  é a incerteza padrão relativa associada à concentração da solução intermédia utilizada para preparar os calibradores com diluições com incerteza desprezável. A  $u'_{sol.m\tilde{a}e}$  é calculada através da combinação das incerteza padrão relativas das variáveis usadas para determinar a concentração da solução intermédia (equação 3.23):

$$u'_{sol.m\tilde{a}e} = \sqrt{\left(\frac{u_m}{m}\right)^2 + \left(\frac{u_b}{v_b}\right)^2 + \left(\frac{u_p}{v_p}\right)^2 + \left(\frac{u_{pur}}{pur}\right)^2 + \left(\frac{u_{fd}}{fd}\right)^2} \quad (3.23)$$

Quando é utilizada a mesma pipeta para diluição da solução intermédia, deve-se adicionar o quadrado da incerteza padrão relativa da tolerância do valor nominal da pipeta dentro da raiz quadrada da equação 3.19.

No Anexo D, encontra-se apresentada a folha de cálculo de MS -Excel desenvolvida. Apenas para título de exemplo são apresentados valores adquiridos experimentalmente para a curcumina com vista à determinação da concentração de dois padrões de controlo.

### *3.7. Calibração por regressão ponderada para a determinação da concentração de uma amostra desconhecida.*

---

Para a determinação da concentração de uma amostra desconhecida ou solução de referência foi desenvolvida e validada uma folha de cálculo onde estão inseridos todos os dados necessários à determinação da concentração e respetiva incerteza.

O modelo de avaliação da incerteza foi desenvolvido considerando também resultados de 5 replicados de cada um dos calibradores; ou seja, através de uma calibração do HPLC-UV/Vis com um número de sinais replicados superior ao proposto para ensaios de rotina. O desvio padrão dos sinais replicados serviu para o cálculo do fator de ponderação,  $w_i$ , associado a cada nível de concentração,  $x_i$ . Assumiu-se que a variação relativa da precisão ao longo da gama de calibração não varia de dia para dia como observado noutros métodos instrumentais de análise[17], [20]. Os dados da variação da precisão do sinal instrumental com a concentração são identificados como “Historial de variação da precisão com a concentração”.

Na folha de cálculo são discriminados todos os cálculos intermédios até se chegar ao resultado final incluindo o controlo da qualidade da calibração através do cálculo do quadrado do coeficiente de correlação linear de Pearson e análise de padrões de controlo. Os LD e LOQ são estimados em condições de repetibilidade para a calibração diária. A folha de cálculo também permite a avaliação de resultados da fortificação de amostras reais. As quantificações são realizadas entre os padrões mais baixos e mais altos da gama de calibração bem acima do LQ da medição.

Começa-se por registar os sinais dos calibradores, calcular os fatores de ponderação,  $w_i$  através da equação 1.15 considerando o “historial de variação da precisão com a concentração”, e os parâmetros de regressão da reta; i.e. o declive ponderado,  $b_w$  calculado pela equação 1.17 e ordenada na origem ponderada,  $a_w$  determinada através da equação 1.17. Seguidamente é feita uma comparação da concentração conhecida dos padrões de controlo com a concentração estimada pelo método, avaliando assim a compatibilidade metrológica das duas estimativas da mesma concentração. É utilizada para esta comparação a equação 3.16 já mencionada no anteriormente.

Os parâmetros da linha de regressão vão servir posteriormente para o cálculo da concentração do item analisado,  $\bar{q}_0$ , através da equação 3.24.

$$\bar{q}_0 = \frac{(\bar{y}_0 - a_w)}{b_w} \quad (3.24)$$

Em que  $\bar{y}_0$  é o sinal do item analisado (amostra, padrão de controlo ou ensaios de recuperação).

Por fim, ao medir experimentalmente o valor do sinal da amostra desconhecida, esta mesma é introduzida na folha de cálculo e todos os cálculos são efetuados automaticamente surgindo o valor da concentração com a incerteza associada.

No caso do método de regressão linear ponderado, o LD e LQ não podem ser estimados através do desvio padrão residual ponderado pois este sobrestima a precisão junto ao LD e LQ. Desta forma, estes limites foram estimados em condições de repetibilidade, isto é, para curva de calibração diária, identificando a concentração à qual a incerteza padrão relativa de interpolação é 33 % ou 10 % para a determinação do LD ou LQ respetivamente. Estes cálculos foram realizados numa folha de cálculo validada que descreve detalhadamente a variação de  $s'_{x0}$  com a concentração.

As calibrações de rotina envolvem a leitura duplicada dos calibradores para reduzir o dispêndio de tempo com a calibração. Os padrões de controlo e ensaios de recuperação são lidos entre a análise das amostras terminado forçosamente a sequência de leitura com a análise de uma destas referências.

A folha de cálculo foi desenvolvida para ser utilizada em rotina, e está assim preparada para que ao serem obtidos os sinais instrumentais, sejam colocados na folha de cálculo e automaticamente sejam calculados todos os parâmetros desejados, concentração da amostra desconhecida com respetiva incerteza, LOD e LOQ da calibração diária e comparação de padrões de controlo para confirmar a compatibilidade da resposta instrumental com a concentração conhecida.

### 3.7.1. Incerteza associada à concentração estimada por HPLC-UV/Vis

Para calcular a incerteza padrão associada à concentração estimada,  $u_{\bar{q}_0}$ , utiliza-se a equação 3.25:

$$u_{\bar{q}_0} = \bar{q}_0 \sqrt{\left(\frac{s_{x0w}}{\bar{x}_0}\right)^2 + (u'_{SI})^2} \quad (3.25)$$

Esta equação é similar à correspondente usada para o modelo de regressão não ponderado: combina a incerteza padrão relativa associada à interpolação estatística do sinal do item,  $\frac{s_{x0w}}{\bar{x}_0}$ , com a incerteza padrão relativa da concentração da solução intermédia,  $u'_{SI}$ .

Depois de determinada a incerteza padrão combinada, multiplica-se o valor obtido por um fator de expansão  $k$ , para se obter a incerteza padrão combinada expandida. Neste caso utilizou-se um facto de expansão de 3, para um nível de confiança de aproximadamente 99 %. Verificou-se, através do cálculo da incerteza da determinação das concentrações dos padrões de controlo, que a incerteza expandida relativa não ultrapassava o valor dos 20 % que é a menor incerteza alvo definida em análises de alimentos e ambientais [24].

### 3.7.2. *Definição do modelo de variação da precisão do sinal com a concentração*

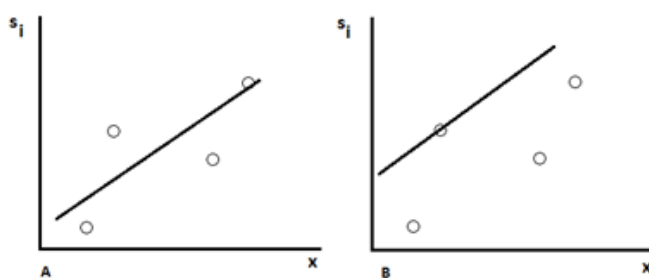
Os fatores de ponderação do modelo de regressão linear ponderado podem ser determinados em condições de repetibilidade se os sinais dos calibradores forem medidos, pelo menos, em quintuplicado, ou recorrendo a um conhecimento prévio (i.e. um historial) da variação da precisão com a concentração. A utilização do historial da variação da precisão com a concentração permite reduzir o número de leituras dos calibradores nos ensaios de rotina para um ou dois replicados.

Neste trabalho optou-se estudar a variação da precisão com a concentração através de múltiplas leituras num determinado dia, e avaliar se o modelo de variação da precisão seria adequado para definir os fatores de ponderação de regressões realizadas posteriormente.

Tendo em conta que para os sistemas analíticos estudados a precisão da resposta instrumental aumenta com a concentração de uma forma adequadamente descrita por uma reta, optou-se por definir o modelo de variação do desvio padrão da resposta



instrumental,  $s_i$ , com a concentração,  $x_i$ , através de uma regressão linear não ponderada. Os residuais observados nestas relações lineares foram atribuídos à variabilidade das estimativas dos desvios padrões considerando um número limitado de ensaios replicados. A figura 3.3.A apresenta um exemplo de modelo de variação da  $s_i$  com  $x_i$ . Tendo em conta que a aplicação deste tipo de modelo apresentou taxas de insucesso elevadas nos estudos da compatibilidade metrológica entre concentrações conhecidas e estimadas dos padrões de controlo, optou-se por majorar as precisões estimadas subindo a linha de regressão da figura 3.3.A para o mais elevado residual. A figura 3.3.B apresenta o modelo majorado de variação de  $s_i$  com  $x_i$ .



*Figura 3.3 - A) Variação estimada de  $s_i$  com a concentração  $x_i$  (o) e modelo inicialmente definido para variação de  $s_i$  com  $x_i$  (—); B) Modelo majorado de variação de  $s_i$  com a concentração  $x_i$ .*

Depois de realizar o ajuste descrito foram obtidos mais resultados compatíveis: o amarelo sol, que tinha 6 padrões incompatíveis de entre 45 analisados, passou a ter 4 (um de  $1,5 \text{ mg L}^{-1}$ , um de  $3 \text{ mg L}^{-1}$ , um de  $6 \text{ mg L}^{-1}$  e um de  $7,5 \text{ mg L}^{-1}$ ). O azul brilhante que tinha 4 incompatibilidades passou para duas (ambos  $1,5 \text{ mg L}^{-1}$ ) e o preto que apresentava 6 incompatibilidades passou para 3 (um de  $1,5 \text{ mg L}^{-1}$ , um de  $4,5 \text{ mg L}^{-1}$  e um de  $6 \text{ mg L}^{-1}$ ). Estas falhas de compatibilidade não são em exagero podendo-se confirmar a compatibilidade dos teores esperados e estimados dos padrões. Para confirmar a adequação da estratégia seguida seria útil recolher mais resultados de estudos de compatibilidade.

No Anexo D, encontra-se apresentada a folha MS-Excel desenvolvida. Apenas a título de exemplo foram colocados valores adquiridos experimentalmente para o azul brilhante, e na secção da determinação da concentração de amostra desconhecida foram colocados os valores de dois dos padrões de controlo estudados.

### 3.8. Precisão intermediária da resposta instrumental

---

A leitura de padrões de controlo em calibrações diárias realizadas em diferentes dias permitiu a determinação da precisão intermédia das quantificações. Este parâmetro de desempenho não faz falta para a avaliação da incerteza realizada.

Foram quantificados padrões de controlo em 10 dias diferentes. Os calibradores foram lidos em duplicado e os padrões de controlo só uma vez como acontecerá com a grande generalidade das amostras.

Apenas foi estudado o desempenho das determinações de o azul brilhante, preto brilhante e amarelo-sol visto que os sinais dos restantes corantes eram muito instáveis. Por falta de tempo não foi possível identificar e corrigir a origem da instabilidade observada.

Os resultados obtidos para os corantes estudados estão apresentados no anexo C ( da tabela C.14 à C.16) .

Para calcular a precisão intermediária relativa,  $s'_{PI}$ , da gama de calibração foi utilizada a equação 3.26 que reúne dados dos diversos padrões de controlo.

$$s'_{PI} = \sqrt{\frac{\sum(n-1) \times s'^2_i}{\sum(n-1)}} \quad (3.26)$$

Onde  $n$  é o numero de dias estudados e  $s'_i$  é o desvio padrão dos resultados dos diversos dias do padrão de controlo do nível de concentração com índice  $i$ .

No Anexo C (da tabela C.15 à C.17) podem ser vistos os dados utilizados e cálculos intermédios. Os desvios padrão relativos da precisão intermédia estimados formam os seguintes:

Amarelo sol:  $s'_{PI} = 9,03 \%$

Azul brilhante:  $s'_{PI} = 5,28 \%$

Preto brilhante:  $s'_{PI} = 7,63 \%$

Pela observação dos valores de precisão intermédia relativa para cada nível de concentração, Anexo C (da tabela C.15 à C.17) pode-se ver que este desvio padrão relativo é contante ao longo da concentração. Esta tendência é observada acima do dobro do limite de quantificação das medições[24].

### 3.9. Recuperação de analito em amostras reais

---

Por fim foi avaliada a recuperação de analito adicionado a amostras reais para identificar possíveis fontes de incerteza da medição não identificadas anteriormente. Para tal foram elaboradas soluções padrão utilizando sumos comerciais como solvente posteriormente analisadas em HPLC-UV/Vis. Os sumos foram analisados antes da fortificação para a verificação da ocorrência de analito nativo.

A recuperação de analito é calculada com recurso à equação 3.27:

$$R = \frac{c_{fort} - c_{nat}}{c_{ad}} \quad (3.27)$$

Onde  $c_{fort}$  é a concentração estimada da amostra fortificada,  $c_{nat}$ , é a concentração de analito nativo no sumo e  $c_{ad}$  é a concentração que foi adicionada ao sumo.

O intervalo estimado da recuperação considerando a respetiva incerteza padrão,  $u_R$ , e um fator de expansão de 3 para um nível de confiança de aproximadamente 99 % (i.e.  $R \pm 3 \times u_R$ ) deve incluir o valor 1 (i.e. a recuperação ideal de 100 %).

A  $u'_R$  é calculada através da equação 3.28:

$$u_R = R \sqrt{\left(\frac{u_{c_{ad}}}{c_{ad}}\right)^2 + \left(\frac{u_{c_{fort}}^2 + u_{c_{nat}}^2}{(c_{fort} - c_{nat})}\right)} \quad (3.28)$$

Onde  $u_{c_{ad}}$  corresponde à incerteza padrão associada a  $c_{ad}$ , que pode ser calculada da mesma forma que foi calculada a incerteza da concentração dos padrões de calibração,  $u_{c_{fort}}$  corresponde à incerteza padrão associada a  $c_{fort}$  e  $u_{c_{nat}}$  corresponde à incerteza padrão associada a  $c_{nat}$ . Estas duas últimas são estimadas como a incerteza associada a quantificação por HPLC-UV/Vis.

Foram realizados ensaios de recuperação para o azul brilhante, preto brilhante e amarelo sol.

A grande maioria das recuperações estimadas apresenta desvios ao valor de 100 % que não podem ser explicados pelas componentes de incerteza identificadas.

Tendo em conta os princípios das determinações por HPLC-UV/Vis e a robustez da técnica a efeitos de matriz, suspeita-se que o analito adicionado possa ter sido parcialmente adsorvido às partículas do sumo que se encontram em suspensão. Assim, no futuro serão realizados ensaios de recuperação em sumo após a sua filtração para avaliar a hipótese formulada.

---

## *4. Conclusões*

---



Este trabalho visou o desenvolvimento, validação e definição do controle interno da qualidade de um método para quantificação de alguns corantes em alimentos de matriz aquosa.

Na sequência do desenvolvimento do método foi definida uma estratégia de preparação dos calibradores capaz de cumprir os pressupostos do modelo de regressão usado relativamente à qualidade destas referências.

A validação da quantificação instrumental iniciou-se com a avaliação da homogeneidade de variâncias da resposta instrumental na gama de calibração, permitindo escolher o tipo de modelo a seguir: modelo não ponderado para sinais homoscedásticos e modelo ponderado para sinais heteroscedásticos.

Foi avaliada a utilização do modelo de regressão linear não ponderado para determinações de curcumina respeitante à gama de concentração de 3 a 12 mg L<sup>-1</sup>, visto que os respetivos sinais são homoscedásticos, bem como do modelo linear ponderado para os restantes corantes que apresentaram sinais heteroscedásticos na gama de concentração de 1,5-7,5 mg L<sup>-1</sup> do analito.

O ajuste dos modelos de regressão aos sinais instrumentais foi avaliado através de uma análise estatística em função do comportamento da variância do sinal na gama de calibração. Para avaliar a qualidade do ajuste do modelo de regressão linear não ponderado utilizou-se o teste ANOVA-LOF (ANOVA – Análise de variância; LOF – “lack-of-fit”). Para a avaliação do modelo de regressão linear ponderado recorreu-se a um teste Chi-Quadrado ( $\chi^2$ ). Os resultados obtidos indicaram o ajuste do modelo de regressão para descrever a variação do sinal com a concentração.

Neste trabalho foi proposto o controlo do limite de quantificação das determinações através do seu cálculo em condições de repetibilidade e a confirmação de que o primeiro ponto da gama de calibração é superior ao limite de quantificação. Em todas as calibrações realizadas, o limite de quantificação é inferior ao ponto mais baixo da gama analítica.

A incerteza das quantificações por HPLC-UV/Vis foi estimada combinando a incerteza de interpolação do sinal do item analisado com a incerteza associada à qualidade dos calibradores.

O modelo desenvolvido de quantificação da incerteza da medição foi avaliado através da análise de padrões de controlo independentes dos calibradores e através da determinação da recuperação de analito adicionado a amostras de refrigerantes.

A compatibilidade metrológica do valor estimado e conhecido da concentração dos padrões de controlo confirmou a adequação das estimativas da incerteza realizadas.

Os ensaios de recuperação realizados não produziram resultados satisfatórios, pois a grande maioria apresentou um desvio ao valor alvo de 100 %, superior ao previsto pelas componentes de incerteza consideradas. Suspeita-se que este desvio se deve à adsorção de corante nas partículas do sumo que se encontram em suspensão. Esta hipótese será testada no futuro próximo através da análise de sumos após a respetiva filtração.

Foi desenvolvida uma folha de cálculo que contém todos dados e fórmulas necessários para reportar os resultados das amostras com incerteza. A folha de cálculo inclui também o controlo da qualidade das quantificações de rotina, através da avaliação da compatibilidade dos teores estimados e esperados de padrões de controlo e ensaios de recuperação.

O procedimento de medição provou ser adequado visto que a incerteza expandia relativa estimada não ultrapassou o valor alvo de 20 %, habitual em análise de alimentos e ambientais.

Futuramente também será necessário estudar a estabilidade dos corantes curcumina e Ponceau 4R para que seja possível prosseguir a validação da quantificação dos mesmos.



---

## 5. *Anexos*

---



## A. Introdução

---

*Tabela A.1. - Valores críticos de F para um teste bilateral; Probabilidade de 0,01%.*

Graus de liberdade - Denominador	Graus de Liberdade - Numerador									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<b>1</b>	16210,72	198,50	55,55	31,33	22,78	18,63	16,24	14,69	13,61	12,83
<b>2</b>	19999,50	199,00	49,80	26,28	18,31	14,54	12,40	11,04	10,11	9,43
<b>3</b>	21614,74	199,17	47,47	24,26	16,53	12,92	10,88	9,60	8,72	8,08
<b>4</b>	22499,58	199,25	46,19	23,15	15,56	12,03	10,05	8,81	7,96	7,34
<b>5</b>	23055,80	199,30	45,39	22,46	14,94	11,46	9,52	8,30	7,47	6,87
<b>6</b>	23437,11	199,33	44,84	21,97	14,51	11,07	9,16	7,95	7,13	6,54
<b>7</b>	23714,57	199,36	44,43	21,62	14,20	10,79	8,89	7,69	6,88	6,30
<b>8</b>	23925,41	199,37	44,13	21,35	13,96	10,57	8,68	7,50	6,69	6,12
<b>9</b>	24091,00	199,39	43,88	21,14	13,77	10,39	8,51	7,34	6,54	5,97
<b>10</b>	24224,49	199,40	43,69	20,97	13,62	10,25	8,38	7,21	6,42	5,85

## B. Parte Experimental

### Amarelo sol

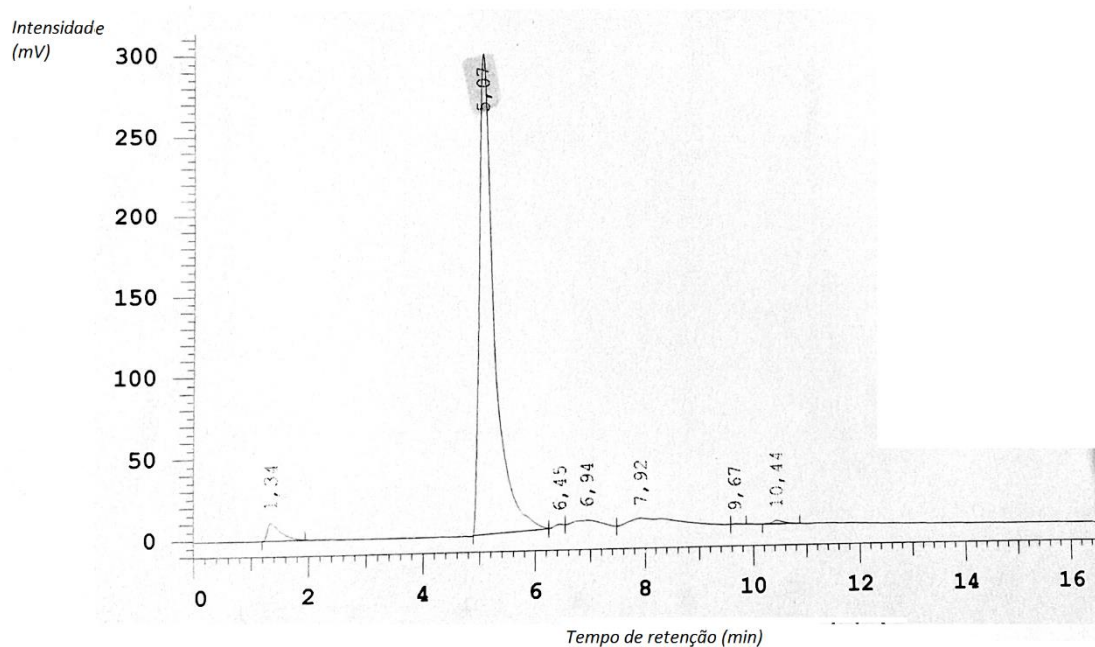


Figura **Erro! Use a guia Página Inicial para aplicar Cabeçalho 2 ao texto que deverá aparecer aqui..1** - Cromatograma do composto puro do corante amarelo sol.

### Azul brilhante

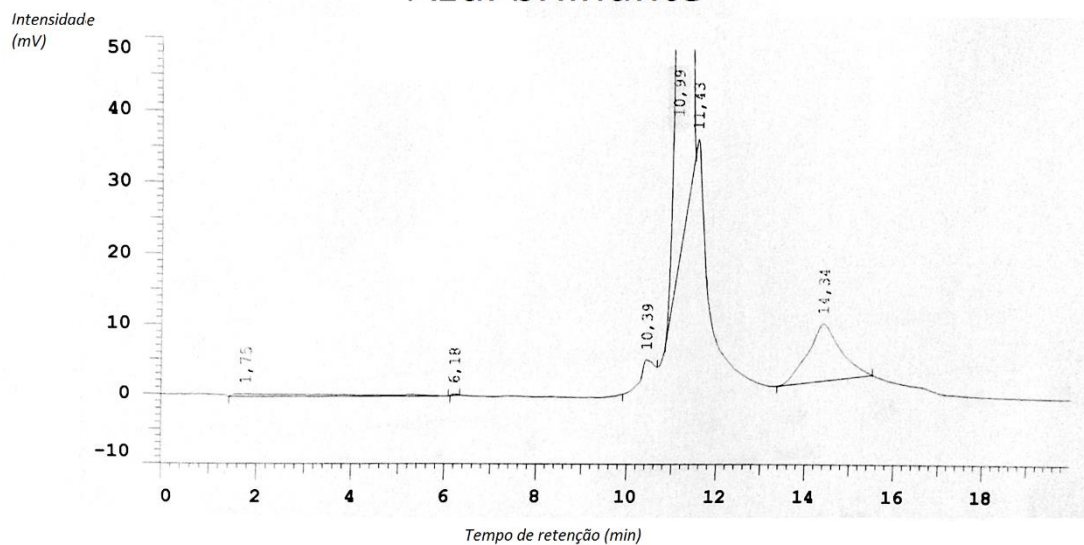
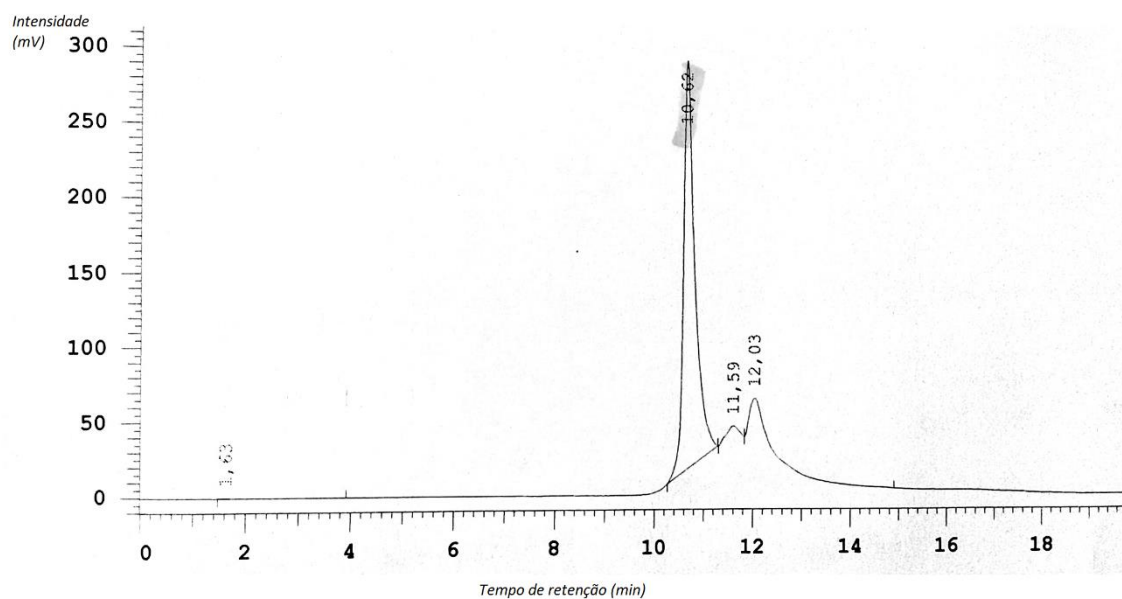


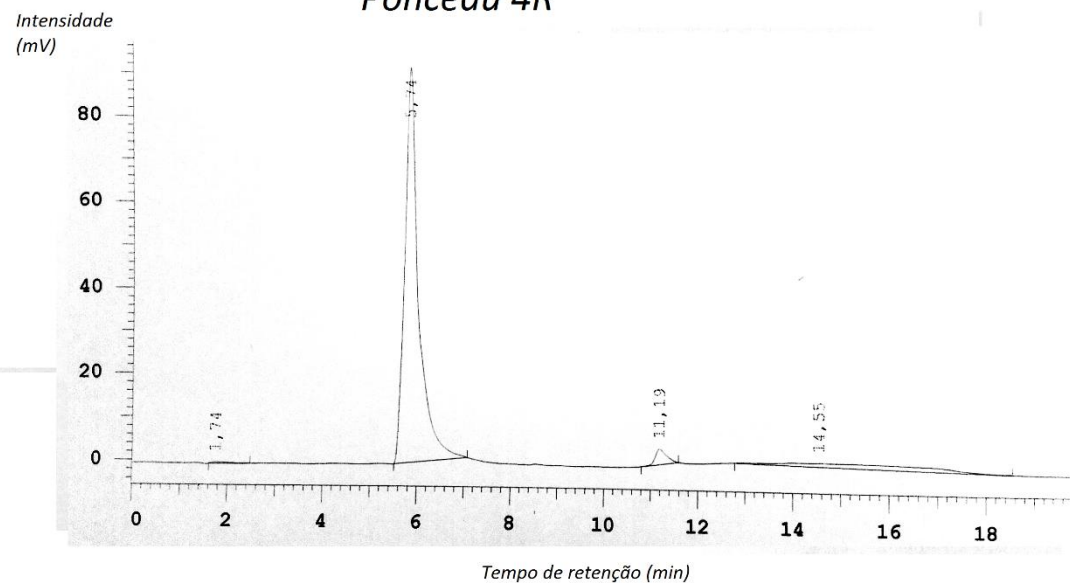
Figura **Erro! Use a guia Página Inicial para aplicar Cabeçalho 2 ao texto que deverá aparecer aqui..2** - Cromatograma do composto puro do corante azul brilhante

## Curcumina

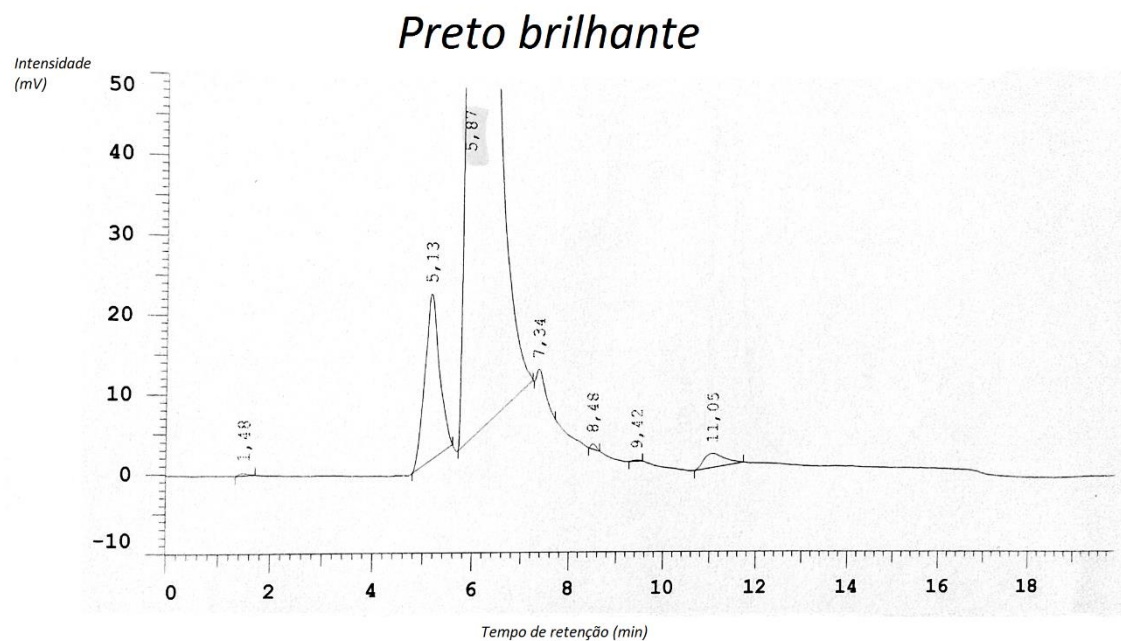


**Figura Erro! Use a guia Página Inicial para aplicar Cabeçalho 2 ao texto que deverá aparecer aqui..3 - Cromatograma do composto puro do corante curcumina**

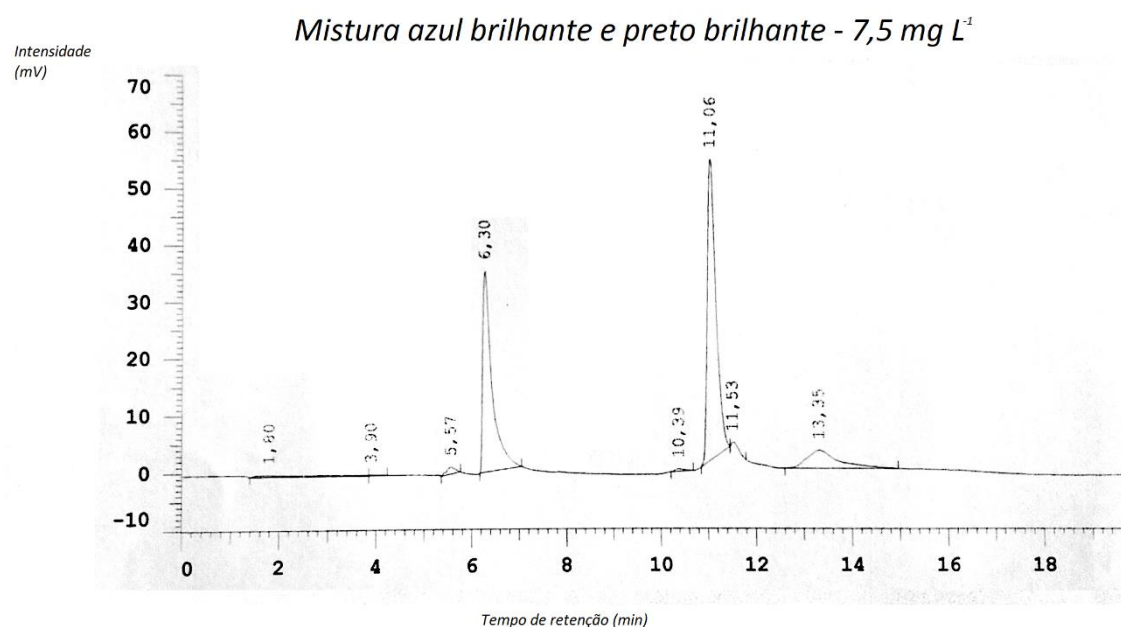
## Ponceau 4R



**Figura Erro! Use a guia Página Inicial para aplicar Cabeçalho 2 ao texto que deverá aparecer aqui..4 - Cromatograma do composto puro do corante ponceau 4R**

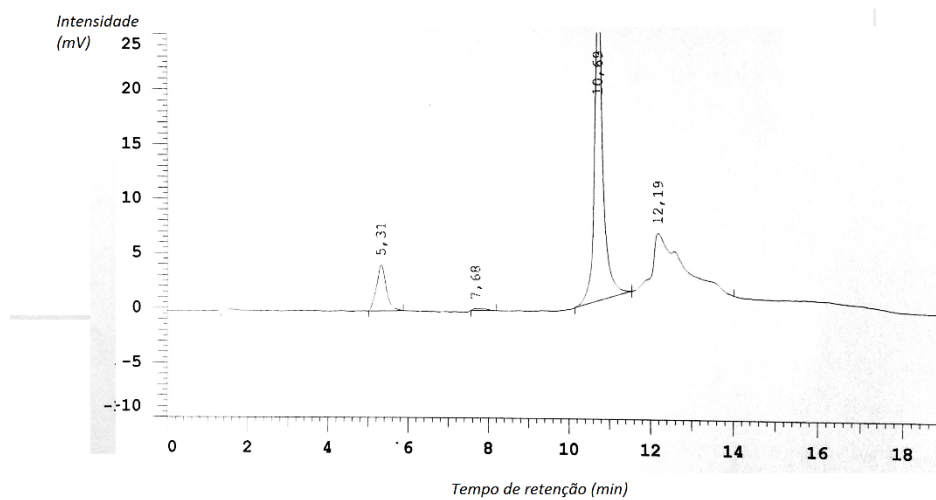


**Figura Erro! Use a guia Página Inicial para aplicar Cabeçalho 2 ao texto que deverá aparecer aqui..5 - Cromatograma do composto puro do corante preto brilhante**



**Figura Erro! Use a guia Página Inicial para aplicar Cabeçalho 2 ao texto que deverá aparecer aqui..6 – Cromatograma da mistura de azul brilhante e preto brilhante**

*Mistura curcumina e ponceau 4R - 4,5 mg L<sup>-1</sup>*



**Figura Erro! Use a guia Página Inicial para aplicar Cabeçalho 2 ao texto que deverá aparecer aqui..7 - Cromatograma da mistura de curcumina e ponceau 4R**

## C. Tratamento e Discussão de Resultados

*Tabela Erro! Use a guia Página Inicial para aplicar Cabeçalho 2 ao texto que deverá aparecer aqui..1 - Resultados para o cálculo da repetibilidade da pipeta utilizada na preparação dos calibradores*

PIPETA 1mL	
Medições	m água (g)
1	1,0087
2	0,9861
3	0,9979
4	0,9975
5	0,9924
6	0,984
7	0,9895
8	0,984
9	0,9781
10	1,0017
Média	0,99199
Dev. Pad.	0,009430854

*Tabela Erro! Use a guia Página Inicial para aplicar Cabeçalho 2 ao texto que deverá aparecer aqui..2 - Resultados para o cálculo da repetibilidade do balão de 20 mL utilizada na preparação dos calibradores*

BALAO 20mL		
Erro máx (mL)		0.04
Peso balão vazio (g)		21.9471
Medições	m água+balão (g)	m água (g)
1	41,9023	41,9023
2	41,8674	41,8674
3	41,889	41,889
4	41,8952	41,8952
5	41,9273	41,9273
6	41,917	41,917
7	41,927	41,927
8	41,9332	41,9332
9	41,9388	41,9388
10	41,9281	41,9281
Média	41,91253	



Dev. Pad.	0,0231
-----------	--------

**Tabela Erro! Use a guia Página Inicial para aplicar Cabeçalho 2 ao texto que deverá aparecer aqui..3** - Valores críticos de T para o teste de valores aberrantes únicos de Grubbs

Valores críticos				
Observações	Níveis de confiança			
n	99%	97.50%	95%	90%
3	1,155	1,155	1,153	1,148
4	1,492	1,481	1,463	1,425
5	1,749	1,715	1,672	1,602
6	1,944	1,887	1,822	1,729
7	2,097	2,02	1,938	1,828
8	2,221	2,126	2,032	1,909
9	2,323	2,215	2,11	1,977
10	2,41	2,29	2,176	2,036
11	2,485	2,355	2,234	2,088
12	2,55	2,412	2,285	2,134
13	2,607	2,462	2,331	2,175
14	2,659	2,507	2,371	2,213
15	2,705	2,549	2,409	2,247
16	2,747	2,585	2,443	2,279
17	2,785	2,62	2,475	2,309
18	2,821	2,651	2,504	2,335
19	2,854	2,681	2,532	2,361
20	2,884	2,709	2,557	2,385

**Tabela Erro! Use a guia Página Inicial para aplicar Cabeçalho 2 ao texto que deverá aparecer aqui..4** - Valores dos sinais experimentais para o cálculo da homogeneidade de variâncias do corante Azul-Brilhante

	1.5 mg/L	7.5 mg/L
Rep.1	115958	684337
Rep.2	111809	675291
Rep.3	111517	666127
Rep.4	111352	671414
Rep.5	109344	665470
Rep.6	109846	653099
Rep.7	107117	651838
Rep.8	108760	644248
Rep.9	106904	637101
Rep.10	107668	670839
Média	110027,5	661976.4
Desv.Pad, s	2753,152869	14866.06
S <sup>2</sup>	7579850,722	2.21E+08
RSD	2,50%	2.25%
RSD/3	0,83%	0.75%
F calculado	29,15622908	
F crítico	6,541089627	

**Tabela Erro! Use a guia Página Inicial para aplicar Cabeçalho 2 ao texto que deverá aparecer aqui..5** - Valores dos sinais experimentais para o cálculo da homogeneidade de variâncias do corante Preto-Brilhante

	1.5 mg/L	7.5 mg/L
Rep.1	77686	470591
Rep.2	70175	482934
Rep.3	71075	467259
Rep.4	74361	477814
Rep.5	77300	488353
Rep.6	70869	500088
Rep.7	78359	475179
Rep.8	81565	484324
Rep.9	74790	458085
Rep.10	71056	521249
Média	74723.6	482587.6
Desv.Pad, s	3914.1013	17932.84
S <sup>2</sup>	15320189	3.22E+08
RSD	5,24%	3.72%
RSD/3	1,75%	1.24%
F calculado	20,99103191	
F crítico	6,541089627	

**Tabela Erro! Use a guia Página Inicial para aplicar Cabeçalho 2 ao texto que deverá aparecer aqui..6** - Valores dos sinais experimentais para o cálculo da homogeneidade de variâncias do corante Amarelo-sol

	1.5 mg/L	7.5 mg/L
Rep.1	29866	270725
Rep.2	32743	-
Rep.3	34621	258382
Rep.4	27948	259108
Rep.5	31269	246075
Rep.6	30495	246960
Rep.7	33715	248968
Rep.8	34687	267270
Rep.9	33325	251197
Rep.10	31592	274693
Média	32026,1	258153.1111
Desv.Pad, s	2192,669781	10721.60455
S <sup>2</sup>	4807800,767	114952804.1
RSD	6,85%	4.15%
RSD/3	2,28%	1.38%
F calculado	23,90964387	
F crítico	6,541089627	

**Tabela Erro! Use a guia Página Inicial para aplicar Cabeçalho 2 ao texto que deverá aparecer aqui..7** - Valores dos sinais experimentais para o cálculo da homogeneidade de variâncias do corante Ponceau 4R

	1.5 mg/L	7.5 mg/L
Rep.1	15352	119839
Rep.2	16776	124056
Rep.3	15501	108355
Rep.4	-	116883
Rep.5	15647	108818
Rep.6	15230	107086
Rep.7	15749	103060
Rep.8	14799	108174
Rep.9	16164	109382
Rep.10	13056	112963
Média	15363,77778	111861.6
Desv.Pad, s	1033,502271	6500.862459
S <sup>2</sup>	1068126,944	42261212.71
RSD	6,73%	5.81%
RSD/3	2,24%	1.94%
F calculado	39,56572103	
F crítico	6,541089627	

**Tabela Erro! Use a guia Página Inicial para aplicar Cabeçalho 2 ao texto que deverá aparecer aqui..8** - Valores dos sinais experimentais para o cálculo da homogeneidade de variâncias do corante Curcumina

	<b>3 mg/L</b>	<b>15 mg/L</b>
<b>Rep.1</b>	529480	2917822
<b>Rep.2</b>	575312	2943363
<b>Rep.3</b>	628307	3072042
<b>Rep.4</b>	592025	3022861
<b>Rep.5</b>	595226	2973575
<b>Rep.6</b>	710288	3258788
<b>Rep.7</b>	729016	3352380
<b>Rep.8</b>	682802	3142904
<b>Rep.9</b>	884864	3122448
<b>Rep.10</b>	782252	3236157
Média	670957,2	3104234
Desv.Pad, s	108601,7371	145316.7993
$S^2$	11794337309	21116972168
RSD	16,19%	4.68%
RSD/3	5,40%	1.56%
F calculado	1,790433122	
F crítico	6,541089627	

**Tabela Erro! Use a guia Página Inicial para aplicar Cabeçalho 2 ao texto que deverá aparecer aqui..9** - Sinais instrumentais obtidos para 5 níveis de concentração de cada corante em condições de repetibilidade

	<b>Azul Brilhante</b>	<b>Preto Brilhante</b>	<b>Amarelo sol</b>	<b>Ponceau 4R</b>		<b>Curcumina</b>
<b>Conc. (mg/L)</b>	<b>Sinal (nm)</b>	<b>Sinal (nm)</b>	<b>Sinal (nm)</b>	<b>Sinal (nm)</b>	<b>Conc. (mg/L)</b>	<b>Sinal (nm)</b>
<b>1,5</b>	129077	97129	50062	19048	<b>3</b>	710288
<b>1,5</b>	128464	96754	51612	22646	<b>3</b>	729016
<b>1,5</b>	126852	96283	55655	22426	<b>3</b>	682802
<b>1,5</b>	125282	93072	52280	23378	<b>3</b>	884864
<b>1,5</b>	131887	100698	52162	22606	<b>3</b>	782252
<b>3</b>	256877	195947	111707	44193	<b>6</b>	1066358
<b>3</b>	256139	205873	115767	46468	<b>6</b>	985972
<b>3</b>	252206	206639	111744	46902	<b>6</b>	1045106
<b>3</b>	260474	199092	110425	45783	<b>6</b>	1066623
<b>3</b>	262322	208438	114639	43387	<b>6</b>	1063720
<b>4,5</b>	382256	290553	175728	70453	<b>9</b>	1489393
<b>4,5</b>	386260	311314	181202	71809	<b>9</b>	1402853
<b>4,5</b>	367571	297202	176930	68649	<b>9</b>	1642225
<b>4,5</b>	383053	311360	168706	73327	<b>9</b>	1593596
<b>4,5</b>	392418	311368	183000	71569	<b>9</b>	1337107
<b>6</b>	516215	412396	233539	89342	<b>12</b>	1984795
<b>6</b>	510326	411028	243240	95364	<b>12</b>	1959777
<b>6</b>	496384	401910	237166	93052	<b>12</b>	2026726
<b>6</b>	518263	414105	226077	98265	<b>12</b>	1801699
<b>6</b>	516161	411965	230969	98194	<b>12</b>	1918931
<b>7,5</b>	641556	511298	299226	115699	<b>15</b>	2917822
<b>7,5</b>	640907	517628	300598	113081	<b>15</b>	2943363
<b>7,5</b>	626260	509914	288104	117526	<b>15</b>	3072042
<b>7,5</b>	661536	525366	304197	123364	<b>15</b>	3022861
<b>7,5</b>	640564	522732	310530	120337	<b>15</b>	2973575

**Tabela Erro! Use a guia Página Inicial para aplicar Cabeçalho 2 ao texto que deverá aparecer aqui..10** - Valores de desvio padrão, parâmetros da linha de regressão ponderada e fator de ponderação calculados para o corante Amarelo-sol

<b>Amarelo Sol</b>		
<b>Concentração (mg L<sup>-1</sup>)</b>	<b><math>S_i</math></b>	<b><math>w_i</math></b>
<b>1,5</b>	2045,896429	2,348164154
<b>3</b>	2242,739129	1,954061474
<b>4,5</b>	5567,900251	0,317039117
<b>6</b>	6468,735402	0,234885912
<b>7,5</b>	8209,101656	0,145849342
<b><math>a_w</math></b>	-9440,08	
<b><math>b_w</math></b>	40982,94	
<b><math>SS_{RW}</math></b>	220046221,87	
<b><math>SS_{EPW}</math></b>	196573847,68	
<b><math>SS_{LOFW}</math></b>	23472374,19	
<b><math>MS_{PEW}</math></b>	9828692,38	
<b><math>MS_{LOFW}</math></b>	7824124,73	

**Tabela Erro! Use a guia Página Inicial para aplicar Cabeçalho 2 ao texto que deverá aparecer aqui..11** - Valores de desvio padrão, parâmetros da linha de regressão ponderada e fator de ponderação calculados para o corante Azul Brilhante

<b>Azul- Brilhante</b>		
<b>Concentração (mg L<sup>-1</sup>)</b>	<b><math>S_i</math></b>	<b><math>w_i</math></b>
<b>1,5</b>	2485,027827	3,151829783
<b>3</b>	3946,820911	1,249483216
<b>4,5</b>	9159,247202	0,232009467
<b>6</b>	8938,141401	0,243630034
<b>7,5</b>	12576,9761	0,123047501
<b><math>a_w</math></b>	-7861,55	
<b><math>b_w</math></b>	69852,04	
<b><math>SS_{RW}</math></b>	428633073,49	
<b><math>SS_{EPW}</math></b>	407563014,72	
<b><math>SS_{LOFW}</math></b>	21070058,76	
<b><math>MS_{PEW}</math></b>	20378150,74	
<b><math>MS_{LOFW}</math></b>	7023352,92	

*Tabela Erro! Use a guia Página Inicial para aplicar Cabeçalho 2 ao texto que deverá aparecer aqui..12 - Valores de desvio padrão, parâmetros da linha de regressão ponderada e fator de ponderação calculados para o corante Preto Brilhante*

<b>Preto-Brilhante</b>		
<b>Concentração (mg L<sup>-1</sup>)</b>	<b><math>S_i</math></b>	<b><math>w_i</math></b>
<b>1,5</b>	2714,277749	2,766025613
<b>3</b>	5382,609562	0,703362181
<b>4,5</b>	9853,177041	0,209899884
<b>6</b>	4810,50171	0,880610833
<b>7,5</b>	6804,652732	0,440101489
<b><math>a_w</math></b>	446,12	
<b><math>b_w</math></b>	85375,59	
<b><math>SS_{RW}</math></b>	405843246,15	
<b><math>SS_{EPW}</math></b>	389273879,38	
<b><math>SS_{LOFW}</math></b>	16569366,77	
<b><math>MS_{PEW}</math></b>	19463693,97	
<b><math>MS_{LOFW}</math></b>	5523122,26	

*Tabela Erro! Use a guia Página Inicial para aplicar Cabeçalho 2 ao texto que deverá aparecer aqui..13 - Valores de desvio padrão, parâmetros da linha de regressão ponderada e fator de ponderação calculados para o corante Ponceau 4R*

<b>Ponceau 4R</b>		
<b>Concentração (mg L<sup>-1</sup>)</b>	<b><math>S_i</math></b>	<b><math>w_i</math></b>
<b>1,5</b>	1701,25342	1,379754281
<b>3</b>	1503,169751	1,767354693
<b>4,5</b>	1738,485778	1,321287993
<b>6</b>	3764,28636	0,281821722
<b>7,5</b>	3998,433856	0,249781311
<b><math>a_w</math></b>	-2581,75	
<b><math>b_w</math></b>	16210,59	
<b><math>SS_{RW}</math></b>	90263851,48	
<b><math>SS_{EPW}</math></b>	79867440,79	
<b><math>SS_{LOFW}</math></b>	10396410,70	
<b><math>MS_{PEW}</math></b>	3993372,04	
<b><math>MS_{LOFW}</math></b>	3465470,23	

**Tabela Erro! Use a guia Página Inicial para aplicar Cabeçalho 2 ao texto que deverá aparecer aqui..14** - Concentrações e respetivo desvio padrão relativo da precisão intermédia para o corante azulm brilhante; Resultados com um valor aberrantes

Azul brilhante					
Seq.	P1	P2	P3	P4	P5
1	1,412956181	2,601496	4,074189	5,586643	7,035208
2	1,205409665	2,977201	4,360583	5,654441	6,045677
3	1,424885437	2,691295	4,071083	6,022535	6,857247
4	1,332323525	2,811513	3,84954	5,687669	6,648987
5	1,467782311	2,881641	4,257802	5,79787	7,205335
6	1,302694555	2,78731	4,164173	5,544785	6,853249
7	1,366950161	2,6231	3,898187	5,19069	6,421166
8	1,345066576	2,572753	4,127478	5,304823	6,612997
9	0,1938671 XX	2,918059	4,301088	5,633391	6,569067
10	1,458678074	3,042524	4,407121	5,815028	7,238433
s <sub>PI</sub>	0,083616538	0,164791	0,185969	0,242194	0,367469
s' <sub>PI</sub>	6,11%	5,91%	4,48%	4,31%	5,45%
n	9	10	10	10	10
(n-1)	8	9	9	9	9
(n-1)*s <sup>2</sup>	2,99%	3,14%	1,81%	1,67%	2,67%
s' <sub>pooled</sub>	5,28%				

**Tabela Erro! Use a guia Página Inicial para aplicar Cabeçalho 2 ao texto que deverá aparecer aqui..15** - Concentrações e respetivo desvio padrão relativo da precisão intermédia para o corante amarelo sol;

Amarelo sol					
Seq.	P1	P2	P3	P4	P5
1	1,393707489	2,758901	4,076901	5,357751	6,510463
2	1,308494969	2,402207	3,846085	6,154726	6,903753
3	1,381408528	2,829571	3,629592	5,757273	6,830251
4	1,450248799	2,852	4,323265	5,894657	7,260167
5	1,804224251	2,881404	4,03787	6,09507	6,459909
6	1,281978882	2,673621	4,448072	5,369324	6,537123
7	1,371684341	2,795685	4,623856	5,840354	6,881507
8	1,351853712	2,503693	4,034641	5,880423	6,974493
9	1,383020578	2,978951	2,739386	6,116361	8,353165
10	1,473037142	2,865197	4,207239	5,812699	7,122373
s <sub>PI</sub>	0,146577923	0,179242	0,526613	0,279946	0,548665
s' <sub>PI</sub>	10,32%	6,51%	13,18%	4,80%	7,86%
n	10	10	10	10	10
(n-1)	9	9	9	9	9
(n-1)*s <sup>2</sup>	9,59%	3,81%	15,63%	2,08%	5,56%



$s'_{\text{pooled}}$	9,03%
----------------------	-------

**Tabela Erro! Use a guia Página Inicial para aplicar Cabeçalho 2 ao texto que deverá aparecer aqui..16** – Concentrações e respetivo desvio padrão relativo da precisão intermédia para o corante preto brilhante; Resultados com dois valores aberrantes

Preto brilhante					
Seq.	Padrão 1	Padrão 2	Padrão 3	Padrão 4	Padrão 5
1	2,02881590 XX	3,057350746	4,309026264	5,920255146	7,183135582
2	1,308494969	2,402206607	3,846085124	6,154725529	6,90375335
3	1,381408528	2,829571112	3,629592163	5,757273005	6,830251373
4	1,450248799	2,85199964	4,323264949	5,894657406	7,260167161
5	1,804224251	2,881404009	4,037869527	6,095069948	6,459909009
6	1,281978882	2,673620839	4,448072041	5,369323732	6,537123069
7	1,371684341	2,795684805	4,623856222	5,840354202	6,881506717
8	1,351853712	2,503692637	4,0346407	5,880423323	6,974493392
9	1,383020578	2,978951352	2,739385534 XX	6,116360954	8,353164962
10	1,473037142	2,865196972	4,207239141	5,812699166	7,12237319
$s_{PI}$	0,155161075	0,203351453	0,30816125	0,226376109	0,524974873
$s'_{PI}$	10,90%	7,30%	7,40%	3,85%	7,45%
n	9	10	9	10	10
(n-1)	8	9	8	9	9
(n-1)* $s'^2$	9,51%	4,80%	4,39%	1,33%	4,99%
$s'_{\text{pooled}}$	7,63%				

*D.Folhas de cálculo*

---



Calibração rotina - Curcumina E100

Replicas totais: 8

Concentração ( x <sub>i</sub> )	Sinal ( y <sub>i</sub> )	Desv. Pad. ( s )	Declive	Interceção	(xi - xi(média))	(yi - yi(média))	(xi - xi(média))*(yi - yi(média))	(xi - xi(média))^2	^yi	(y - ^yi)	(y - ^yi)^2	s(y/x)	LOD	LOQ
2.781	710288	2045.896429	150228.6947	246591.5	-4.1715	-580768.5	2422675.798	17.40141225	664377.5	45910.5	2107774010	72562.80321	1.449046802	4.830156007
2.781	729016				-4.1715	-562040.5	2344551.946	17.40141225	664377.5	64638.5	4178135682			
5.562	1066358	2242.739129			-1.3905	-224698.5	312443.2643	1.93349025	1082163.5	-15805.5	249813830.3			
5.562	985972				-1.3905	-305084.5	424219.9973	1.93349025	1082163.5	-96191.5	9252804672			
8.343	1489393	5567.900251			1.3905	198336.5	275786.9033	1.93349025	1499949.5	-10556.5	111439692.3			
8.343	1402853				1.3905	111796.5	155453.0333	1.93349025	1499949.5	-97096.5	9427730312			
11.124	1984795	6468.735402			4.1715	693738.5	2893930.153	17.40141225	1917735.5	67059.5	4496976540			
11.124	1959777				4.1715	668720.5	2789567.566	17.40141225	1917735.5	42041.5	1767487722			
6.9525	1291056.5													
Média xi	Média yi					SOMA	11618628.66	77.33961		SOMA	31592162462			

Concentração e incerteza associada aos padrões de controle

	Padrão 1	Padrão 2	Padrão 3	Padrão 4	Padrão 5
Sinal da amostra	782252	1063720	1337107	1918931	2973575
q <sub>0</sub> Concentração solução amostra(mg L <sup>-1</sup> )	3.565633723	5.439230512	7.259035979	11.13195787	18.15221456
m	1	1	1	1	1
u inter	0.545041552	0.519013572	0.512591976	0.56139199	0.800532555
u'inter	0.152859658	0.095420404	0.070614332	0.050430661	0.044101096
U'Q	0.153081223	0.095774941	0.071092684	0.051098311	0.044863042
Resultado com incerteza	3.57 ± 0.15	5.439 ± 0.096	7.259 ± 0.071	11.132 ± 0.051	18.152 ± 0.045
Incerteza relativa expandida	4.293%	1.761%	0.979%	0.459%	0.247%

Incerteza associada á preparação do padrão

Vi (mL)		12	EMA		Concentração conhecida dos padrões de controle	
Vf (mL)		20	Repetibilidade		Padrão 1	2.754
Fv		0.6	0.00011595		Padrão 2	5.508
u <sub>vi</sub> cal		0.004618802	Padrão de controle		Padrão 3	8.262
u <sub>vi</sub> rep		0.009430854	massa (mg)		Padrão 4	11.016
u <sub>vf</sub> cal		0.023094011	10.2		Padrão 5	13.77
u <sub>vf</sub> rep		0.023100411	u <sub>bal</sub> EMA		Cpad_dil: (mg L-1)	
u <sub>Fv</sub>		0.001111734	0.00011595		55.08	
			u <sub>bal</sub> cal		Pureza	
			0.00011595		90	
			u <sub>m</sub> (mg)		Pipeta de 1 comum	
			0.000163978		Tol	
			u <sub>v</sub>		Upipeta	
			0.059363742		1	
			u <sub>Pur</sub>		0.008	
			0		0.008	
			u <sub>total</sub> padrão de controle		0.008233217	

Comparação padrão de controlo conhecido vs Padrão de controlo estimado

Padrão de controlo conhecido						Padrão de controlo estimado		
Concentração	2.754	mg/L	abs(dif)	Udif	Não compatível	Concentração	3.565633723	mg/L
u	0.1324124		0.811633723	0.606705916		u	0.152859658	
Concentração	5.508	mg/L	abs(dif)	Udif	Compatível	Concentração	5.439230512	mg/L
u	0.26164751		0.068769488	0.835511975		u	0.095420404	
Concentração	8.262	mg/L	abs(dif)	Udif	Compatível	Concentração	7.259035979	mg/L
u	0.39086971		1.002964021	1.19159121		u	0.070614332	
Concentração	11.016	mg/L	abs(dif)	Udif	Compatível	Concentração	11.13195787	mg/L
u	0.52008862		0.115957867	1.567583743		u	0.050430661	
Concentração	13.77	mg/L	abs(dif)	Udif	Não compatível	Concentração	18.15221456	mg/L
u	0.6493062		4.382214563	1.952406477		u	0.044101096	

Padrões de calibração - Diluições

u'mae_diluida para PC: 0.008233	u'CdoPC1= 0.048080029
u'1mL (com tudo): 0.01050116	u'CdoPC2= 0.047503179
u'2mL: 0.00742544	u'CdoPC3= 0.047309333
u'3mL: 0.00606285	u'CdoPC4= 0.047212111
u'4mL: 0.00525058	u'CdoPC5= 0.047153682
u'5mL: 0.00469626	
u'20mL: 0.04619122	

### Concentração e incerteza associada da amostra desconhecida

	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Amostra 4	Amostra 5
Sinal da amostra (Duplicados)	782252 884864	1063720 1063720	1337107 1642225	1918931 2026726	2973575 3072042
Sinal médio ( $y_0$ )	833558	1063720	1489666	1972828.5	3022808.5
q0 Concentração solução amostra(mg L-1)	<b>3.907153032</b>	<b>5.439230512</b>	<b>8.274547698</b>	<b>11.49072754</b>	<b>18.47993824</b>
m	2	2	2	2	2
u inter	0.41688317	0.39079797	0.388699781	0.456008586	0.739370536
u'inter	0.106697426	0.071848025	0.046975351	0.039684919	0.040009362
Uq	0.114299046	0.082716806	0.062342721	0.057051065	0.057277224
<b>Resultado com incerteza</b>	<b><u>3.91 ± 0.11</u></b>	<b><u>5.439 ± 0.083</u></b>	<b><u>8.275 ± 0.062</u></b>	<b><u>11.491 ± 0.057</u></b>	<b><u>18.48 ± 0.057</u></b>
Incerteza relativa expandida	0.029253793	0.015207446	0.007534275	0.004964965	0.003099427

### Incerteza associada á preparação do padrão

Vi (mL)	12	EMA	0.5	Cpad_dil: (mg L-1) 55.62			
Vf (mL)	20	Repetibilidade	0.00011595				
Fv	0.6	Padrão de calibração		Volume	100		
u <sub>vi</sub> cal	0.004618802	massa (mg)	10.3	u <sub>v</sub> Temp	desprezável	Pureza	90
u <sub>vi</sub> rep	0.009430854	u <sub>bal</sub> EMA	0.288675135	u <sub>v</sub> rep	0.013810161	Tol	1
u <sub>vf</sub> cal	0.023094011	u <sub>bal</sub> cal	0.00011595	u <sub>v</sub> cal	0.057735027	u <sub>Pur</sub>	0.577350269
u <sub>vf</sub> rep	0.023100411	u <sub>m</sub> (mg)	0.408248323	u <sub>v</sub>	0.059363742		Upipeta
u <sub>Fv</sub>	0.001111734	u' total		0.040986965			

## Calibração rotina - Azul Brilhante E133

Replicas totais: 10

Concentração ( $x_i$ )	Sinal ( $y_i$ )	Desv. Pad. ( $s$ )	Declive	Interceção	$\wedge y_i$	( $y_i$ - $\wedge y_i$ )	Média ( $y_i$ )	( $y_i$ - $\wedge y_i$ ) <sup>2</sup>	s <sup>2</sup>	w <sub>i</sub>	w <sub>i</sub> *( $y_i$ - $\wedge y_i$ ) <sup>2</sup>	s(y/x)w
1.3905	151189	2714.277749	103693.5209	7322.484187	151508.325	-319.3250441	151565.5	101968.484	1.35735E-07	2.766025613	282047.438	1868.922839
1.3905	151942				151508.325	433.6749559		188073.967			520217.4109	
2.781	292950	5382.609562			295694.1659	-2744.165902	294694.5	7530446.5	3.45155E-08	0.703362181	5296631.272	
2.781	296439				295694.1659	744.8340984		554777.834			390209.7475	
4.1715	441091	9853.177041			439880.0068	1210.993241	440884.5	1466504.63	1.03002E-08	0.209899884	307819.1512	
4.1715	440678				439880.0068	797.9932409		636793.213			133662.8213	
5.562	587564	4810.50171			584065.8476	3498.152383	585264	12237070.1	4.32135E-08	0.880610833	10776096.49	
5.562	582964				584065.8476	-1101.847617		1214068.17			1069121.582	
6.9525	729394	6804.652732			728251.6885	1142.311526	726613.5	1304875.62	2.15967E-08	0.440101489	574277.7041	
6.9525	723833				728251.6885	-4418.688474		19524807.8			8592896.994	
									2.45361E-07	5		

## Cálculos de $a_w$ e $b_w$

n= 5

Padrão	Concentração (q)	Sinal	Desvio Padrão (s)	$s^2$	$w_i$	$w_i q_i y_i$	$w_i q_i$	$w_i y_i$	$n q_w \bar{y}_w$	$w_i q_i^2$	$n q_w^2$
1	1.3905	151189	2714.277749	1.35735E-07	2.766	5.81E+05	3.846158615	418192.646	9098793.658	5.348083555	85.67995502
1	1.3905	151942	2714.277749	1.35735E-07	2.766	5.84E+05	3.846158615	420275.464		5.348083555	
2	2.781	292950	5382.609562	3.45155E-08	0.703	5.73E+05	1.956050226	206049.951		5.439775678	
2	2.781	296439	5382.609562	3.45155E-08	0.703	5.80E+05	1.956050226	208503.982		5.439775678	
3	4.1715	441091	9853.177041	1.03002E-08	0.210	3.86E+05	0.875597365	92584.9496		3.652554407	
3	4.1715	440678	9853.177041	1.03002E-08	0.210	3.86E+05	0.875597365	92498.2609		3.652554407	
4	5.562	587564	4810.50171	4.32135E-08	0.881	2.88E+06	4.897957453	517415.223		27.24243935	
4	5.562	582964	4810.50171	4.32135E-08	0.881	2.86E+06	4.897957453	513364.414		27.24243935	
5	6.9525	729394	6804.652732	2.15967E-08	0.440	2.23E+06	3.059805601	321007.385		21.27329844	
5	6.9525	723833	6804.652732	2.15967E-08	0.440	2.21E+06	3.059805601	318559.981		21.27329844	
SOMA				4.91E-07	10.000	13270627.461	29.27113852	3108452.26		125.9123029	

$q_w$  2.927113852  
 $y_w$  310845.2257  
 $a_w$  7322.484187  
 $b_w$  103693.5209

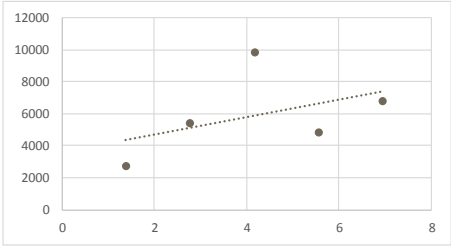




Concentração e incerteza associada aos padrões de controlo

	Padrão 1	Padrão 2	Padrão 3	Padrão 4	Padrão 5
Sinal da amostra	159522	306130	448829	608524	754469
q <sub>0</sub> Concentração solução amostra(mg L <sup>-1</sup> )	1.467782311	2.881641139	4.257802338	5.79786963	7.205334616
m	1	1	1	1	1
s <sub>0</sub>	8374.152126	9147.797995	9900.816194	10743.52176	11513.669
w <sub>0</sub>	0.58118323	0.48703664	0.415769637	0.353103019	0.307444895
s <sub>xow</sub>	0.025767893	0.027785425	0.029771756	0.0320159	0.034082898
u <sub>qo</sub>	0.02854769	0.036796616	0.046442311	0.058145411	0.069283079
U <sub>qo</sub>	0.065831091	0.08485315	0.107096161	0.134083558	0.159767068
Resultado com incerteza	1.468 ± 0.066	2.882 ± 0.085	4.26 ± 0.11	5.8 ± 0.13	7.21 ± 0.16
Incerteza relativa expandida	4.485%	2.945%	2.515%	2.313%	2.217%

Gráfico si vs. xi	
Concentração (x <sub>i</sub> )	Desvio Padrão (s <sub>i</sub> )
1.3905	2714.277749
2.781	5382.609562
4.1715	9853.177041
5.562	4810.50171
6.9525	6804.652732
A (Ordenada na origem)	7571
B (Declive)	547.1874946



Incerteza associada á preparação do padrão

Concentração conhecida dos padrões de controlo					
Padrão 1	1.377				
Padrão 2	2.754				
Padrão 3	4.131				
Padrão 4	5.508				
Padrão 5	6.885				
Cpad_dil: (mg L-1)		27.54			
Vi (mL)	6	EMA		Volume	100
Vf (mL)	20	Repetibilidade			
Fv	0.3	0.00011595		desprezável	0.013810161
u <sub>vi</sub> <sup>cal</sup>	0.004618802	Padrão de controlo			
u <sub>vi</sub> <sup>rep</sup>	0.009430854	massa (mg)		u <sub>v</sub> <sup>rep</sup>	0.057735027
u <sub>vf</sub> <sup>cal</sup>	0.023094011	10.2			
u <sub>vf</sub> <sup>rep</sup>	0.023100411	u <sub>bal</sub> EMA	0	u <sub>v</sub> <sup>cal</sup>	0.008
		u <sub>bal</sub> <sup>cal</sup>	0.00011595		
u <sub>Fv</sub>	0.000718159	u <sub>m</sub> (mg)	0.000163978	u <sub>v</sub>	0.059363742
				u <sub>Pur</sub>	0
					Upipeta
					0.008



Comparação padrão de controle conhecido vs Padrão de controle estimado

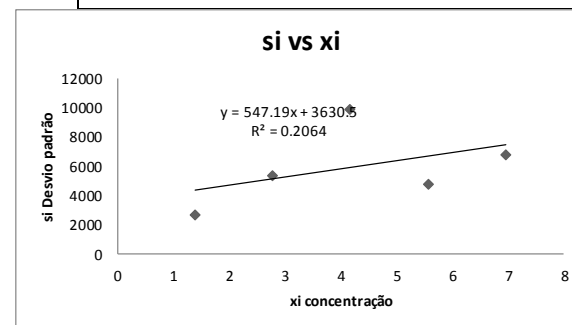
Padrão de controle conhecido			Padrão de controle estimado		
Concentração	1.377	mg/L	abs(dif)	Udif	Compatível
u	0.06623909		0.090782311	0.216386896	
Concentração	2.754	mg/L	abs(dif)	Udif	Compatível
u	0.13089033		0.127641139	0.407892675	
Concentração	4.131	mg/L	abs(dif)	Udif	Compatível
u	0.19553513		0.126802338	0.60292444	
Concentração	5.508	mg/L	abs(dif)	Udif	Compatível
u	0.26017829		0.28986963	0.799789138	
Concentração	6.885	mg/L	abs(dif)	Udif	Compatível
u	0.32482078		0.320334616	0.996382536	
Concentração	1.467782311	mg/L			
u	0.02854769				
Concentração	2.881641139	mg/L			
u	0.036796616				
Concentração	4.257802338	mg/L			
u	0.046442311				
Concentração	5.79786963	mg/L			
u	0.058145411				
Concentração	7.205334616	mg/L			
u	0.069283079				

Padrões de calibração - Diluições	
u'mae_diluida para PC: 0.008372	u'CdoPC1= 0.048103914
u'1mL (com tudo): 0.01050116	u'CdoPC2= 0.047527354
u'2mL: 0.00742544	u'CdoPC3= 0.047333607
u'3mL: 0.00606285	u'CdoPC4= 0.047236435
u'4mL: 0.00525058	u'CdoPC5= 0.047178036
u'5mL: 0.00469626	
u'20mL: 0.04619122	

## Concentração e incerteza associada da amostra desconhecida

	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Amostra 4	Amostra 5
Sinal da amostra (Duplicados)	159522	306130	448829	608524	754469
Sinal médio ( $y_0$ )	137986	301881	480449	733000	841026
$q_0$ Concentração solução amostra ( $\text{mg L}^{-1}$ )	1.363937829	2.861152878	4.41027088	6.398080708	7.622703991
m	2	2	2	2	2
$s_0$	8317.329723	9136.587075	9984.245073	11071.94975	11742.0483
$w_0$	0.58915142	0.488232596	0.408850281	0.332465476	0.295601777
$s_{xow}$	0.018108159	0.0191101	0.021154566	0.0248657	0.027567721
$u_{qo}$	0.058799659	0.118895964	0.182119979	0.263592621	0.31385811
$U_{qo}$	0.135592256	0.274174584	0.419969424	0.607845674	0.723758101
<b>Resultado com incerteza</b>	<b><math>1.36 \pm 0.14</math></b>	<b><math>2.86 \pm 0.27</math></b>	<b><math>4.41 \pm 0.42</math></b>	<b><math>6.4 \pm 0.61</math></b>	<b><math>7.62 \pm 0.72</math></b>
Incerteza relativa expandida	9.941%	9.583%	9.523%	9.500%	9.495%

Gráfico si vs. xi	
Concentração ( $x_i$ )	Desvio Padrão ( $s_i$ )
1.3905	2714.277749
2.781	5382.609562
4.1715	9853.177041
5.562	4810.50171
6.9525	6804.652732
A (Ordenada na origem)	7571
B (Declive)	547.1874946



### Incerteza associada á preparação do calibrador

Vi (mL)	6	EMA	0.5	Repetibilidade	0.00011595	calibrador	Volume	100				
Vf (mL)	20											
Fv	0.3											
u <sub>vi</sub> <sup>cal</sup>	0.004618802											
u <sub>vi</sub> <sup>rep</sup>	0.009430854											
u <sub>vf</sub> <sup>cal</sup>	0.023094011	u <sub>bal</sub> EMA	0.288675135			u <sub>v</sub> <sup>rep</sup>	0.013810161		Pureza	90	Pipeta de 1 comum	1
u <sub>vf</sub> <sup>rep</sup>	0.023100411	u <sub>bal</sub> <sup>cal</sup>	0.00011595			u <sub>v</sub> <sup>cal</sup>	0.057735027		Tol		Tol	0.008
u <sub>Fv</sub>	0.000718159	u <sub>m</sub> (mg)	0.408248323			u <sub>v</sub>	0.059363742		u <sub>pur</sub>	0.577350269	Upipeta	0.008

$u'_{total}$  0.041014981



Limite de quantificação e de Detecção

Multiplo de intervalo		Pontos para gráfico de LQ										Controlo qualidade gráfico: OK	
999		#	Sinal	qi	s0	wo	sxo (ensaios unicos)/(m=1)	sxo/xo	qi	#			
LQ:	1.001071387	1	426	348505.8728	3.010045233	5277.510235	1.463310866	0.112488292	3.7371%	3.010045233	426		
		2	425	347684.8673	3.002962689	5273.634755	1.465462367	0.112414243	3.7434%	3.002962689	425	ponto1	qi sxo/xo 284 1.0056853 0.099546218
LD:	0.301387958	3	424	346863.8619	2.995880145	5269.759276	1.467618617	0.112340378	3.7498%	2.995880145	424	ponto2	285 0.9986027 0.100242797
		4	423	346042.8564	2.988797601	5265.883796	1.469779629	0.112266697	3.7562%	2.988797601	423		
		5	422	345221.851	2.981715057	5262.008317	1.471945417	0.1121932	3.7627%	2.981715057	422		
		6	421	344400.8455	2.974632513	5258.132837	1.474115996	0.112119887	3.7692%	2.974632513	421		AA(Ord. Origem): 0.198456904
		7	420	343579.8401	2.967549969	5254.257358	1.47629138	0.112046759	3.7757%	2.967549969	420		BB(Dclive): -0.098351532
		8	419	342758.8347	2.960467425	5250.381878	1.478471583	0.111973816	3.7823%	2.960467425	419		
		9	418	341937.8292	2.953384881	5246.506399	1.480656619	0.111901059	3.7889%	2.953384881	418		LQ= 1.0011
		10	417	341116.8238	2.946302337	5242.630919	1.482846502	0.111828488	3.7956%	2.946302337	417		
		11	416	340295.8183	2.939219793	5238.755439	1.485041247	0.111756103	3.8022%	2.939219793	416		sinal ao LQ= 115626.4926
		12	415	339474.8129	2.932137248	5234.87996	1.487240869	0.111683905	3.8090%	2.932137248	415		
		13	414	338653.8074	2.925054704	5231.00448	1.489445381	0.111611894	3.8157%	2.925054704	414		
		14	413	337832.802	2.91797216	5227.129001	1.491654799	0.11154007	3.8225%	2.91797216	413	ponto1	qi sxo/xo 383 0.3045134 0.329843106
		15	412	337011.7965	2.910889616	5223.253521	1.493869136	0.111468434	3.8294%	2.910889616	412	ponto2	384 0.2974309 0.33775229
		16	411	336190.7911	2.903807072	5219.378042	1.496088407	0.111396986	3.8362%	2.903807072	411		
		17	410	335369.7856	2.896724528	5215.502562	1.498312628	0.111325726	3.8432%	2.896724528	410		
		18	409	334548.7802	2.889641984	5211.627083	1.500541812	0.111254655	3.8501%	2.889641984	409		AA(Ord. Origem): 0.669897817
		19	408	333727.7747	2.88255944	5207.751603	1.502775975	0.111183774	3.8571%	2.88255944	408		BB(Dclive): -1.116715101
		20	407	332906.7693	2.875476896	5203.876124	1.505015132	0.111113082	3.8642%	2.875476896	407		
		21	406	332085.7638	2.868394352	5200.000644	1.507259297	0.11104258	3.8712%	2.868394352	406		LD= 0.3014
		22	405	331264.7584	2.861311808	5196.125164	1.509508484	0.110972268	3.8784%	2.861311808	405		
		23	404	330443.7529	2.854229264	5192.249685	1.511762711	0.110902147	3.8855%	2.854229264	404		sinal ao LQ= 34519.49185
		24	403	329622.7475	2.84714672	5188.374205	1.51402199	0.110832217	3.8927%	2.84714672	403		
		25	402	328801.742	2.840064176	5184.498726	1.516286338	0.110762478	3.9000%	2.840064176	402		
		26	401	327980.7366	2.832981632	5180.623246	1.518555769	0.110692931	3.9073%	2.832981632	401		
		27	400	327159.7311	2.825899087	5176.747767	1.5208303	0.110623576	3.9146%	2.825899087	400		
		28	399	326338.7257	2.818816543	5172.872287	1.523109944	0.110554414	3.9220%	2.818816543	399		

(...)

---

## *6. Bibliografia*

---

- [1] V. Sharma, H. T. McKone, and P. G. Markow, "A global perspective on the history, use, and identification of synthetic food dyes," *J. Chem. Educ.*, vol. 88, no. 1, pp. 24–28, 2011.
- [2] M. Oplatowska-Stachowiak and C. T. Elliott, "Food Colours: Existing and Emerging Food Safety Concerns," *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, no. May, pp. 1–93, 2015.
- [3] P. Europeu, "Regulamento (CE) N.º 1333/2008 do Parlamento Europeu e do Conselho relativo aos aditivos alimentares," *J. Of. da União Eur.*, vol. 2007, pp. 16–33, 2008.
- [4] "<http://www.asae.pt/> - Visto a 13/08/2015." .
- [5] S. Opinion, "Scientific Opinion on the re-evaluation of curcumin ( E 100 ) as a food," vol. 8, no. 9, 2010.
- [6] S. Opinion, "Scientific Opinion on the re-evaluation of Ponceau 4R ( E 124 ) as a food," vol. 7, no. 11, pp. 1–39, 2009.
- [7] S. Opinion, "Scientific Opinion on the re-evaluation of Brilliant Blue FCF ( E 133 ) as a," vol. 8, no. 11, pp. 1–36, 2010.
- [8] S. Opinion, "Scientific Opinion on the re-evaluation of Brilliant Black BN ( E 151 ) as a," vol. 8, no. 4, pp. 1–30, 2010.
- [9] European Food Safety Authority, "Scientific Opinion on the re-evaluation of Sunset Yellow FCF ( E 110 ) as a food additive," *EFSA J.*, vol. 7, no. 11, p. 1330, 2009.
- [10] S. P. Alves, D. M. Brum, É. C. Branco de Andrade, and A. D. Pereira Netto, "Determination of synthetic dyes in selected foodstuffs by high performance liquid chromatography with UV-DAD detection," *Food Chem.*, vol. 107, no. 1, pp. 489–496, 2008.
- [11] J. C. F. G. I. M. Jcgm, "JCGM 200 : 2008 International vocabulary of metrology — Basic and general concepts and associated terms ( VIM ) Vocabulaire international de métrologie — Concepts fondamentaux et généraux et termes associés ( VIM )," *Int. Organ. Stand. Geneva ISBN*, vol. 3, no. Vim, p. 104, 2008.
- [12] "Requisitos gerais de competencia para laboratórios de ensaio e calibração ( ISO/IEC 17025:2005)," 2005.
- [13] D. A. Skoog, F. J. Holler, and T. A. Nieman, "*Principles of Instrumental Analysis*," Fifth edit. 1998.



- [14] J. N. Miller and J. C. Miller, *"Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry,"* Fourth Edi. 2000.
- [15] R. J. N. Bettencourt da Silva, "Modelação do desempenho de métodos analíticos complexos," 2004.
- [16] Citac and Eurachem, "Guide to Quality in Analytical Chemistry," pp. 1–40, 2002.
- [17] A. P. Garcia Correia, "Desenvolvimento de modelos metrológicos detalhados da determinação de metais pesados em corretivos orgânicos," 2012.
- [18] A. M. Committee, R. Howarth, J. N. Miller, and E. J. Newman, "Is my calibration linear?," *Analyst*, vol. 119, no. 11, p. 2363, 1994.
- [19] R. J. N. Bettencourt da Silva and M. F. Camões, "The Quality of Standards in Least Squares Calibrations," *Anal. Lett.*, vol. 43, no. 7–8, pp. 1257–1266, 2010.
- [20] B. Brasil, R. J. N. Bettencourt da Silva, M. F. G. F. C. Camões, and P. a S. Salgueiro, "Weighted calibration with reduced number of signals by weighing factor modelling: Application to the identification of explosives by ion chromatography," *Anal. Chim. Acta*, vol. 804, pp. 287–295, 2013.
- [21] A. Williams and M. Krysell, "Measurement uncertainty arising from sampling A guide to methods and approaches Produced jointly with EUROLAB , Nordtest and the UK RSC Analytical Methods Committee First Edition 2007 Measurement uncertainty arising from sampling," *Methods*, p. 111, 2007.
- [22] R. Bettencourt, E. Bulska, B. Godlewska-żytkiewicz, I. Papadakis, M. Patriarca, E. Vassileva, and P. Taylor, *"Analytical measurement : measurement uncertainty and statistics,"* First Edit. 2012.
- [23] Citac and Eurachem, "Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement," *English*, vol. 2nd, p. 126, 2000.
- [24] R. da Silva, "Setting Target Measurement Uncertainty in Water Analysis," *Water*, vol. 5, no. 3, pp. 1279–1302, 2013.